

1-23-02

CERTIFICATE OF MAILING - SEPARATE PAPER - PATENT APPLICATION

Attorney Docket No. : 454313-3154.1

Title : IMPROVED DNA VACCINES FOR FARM ANIMALS, IN PARTICULAR BOVINES AND PORCINES

Filed : Herewith

Applicants : Jean-Christophe Francis AUDONNET et al.

109/760574
01/16/01
JC868 U.S. PRO



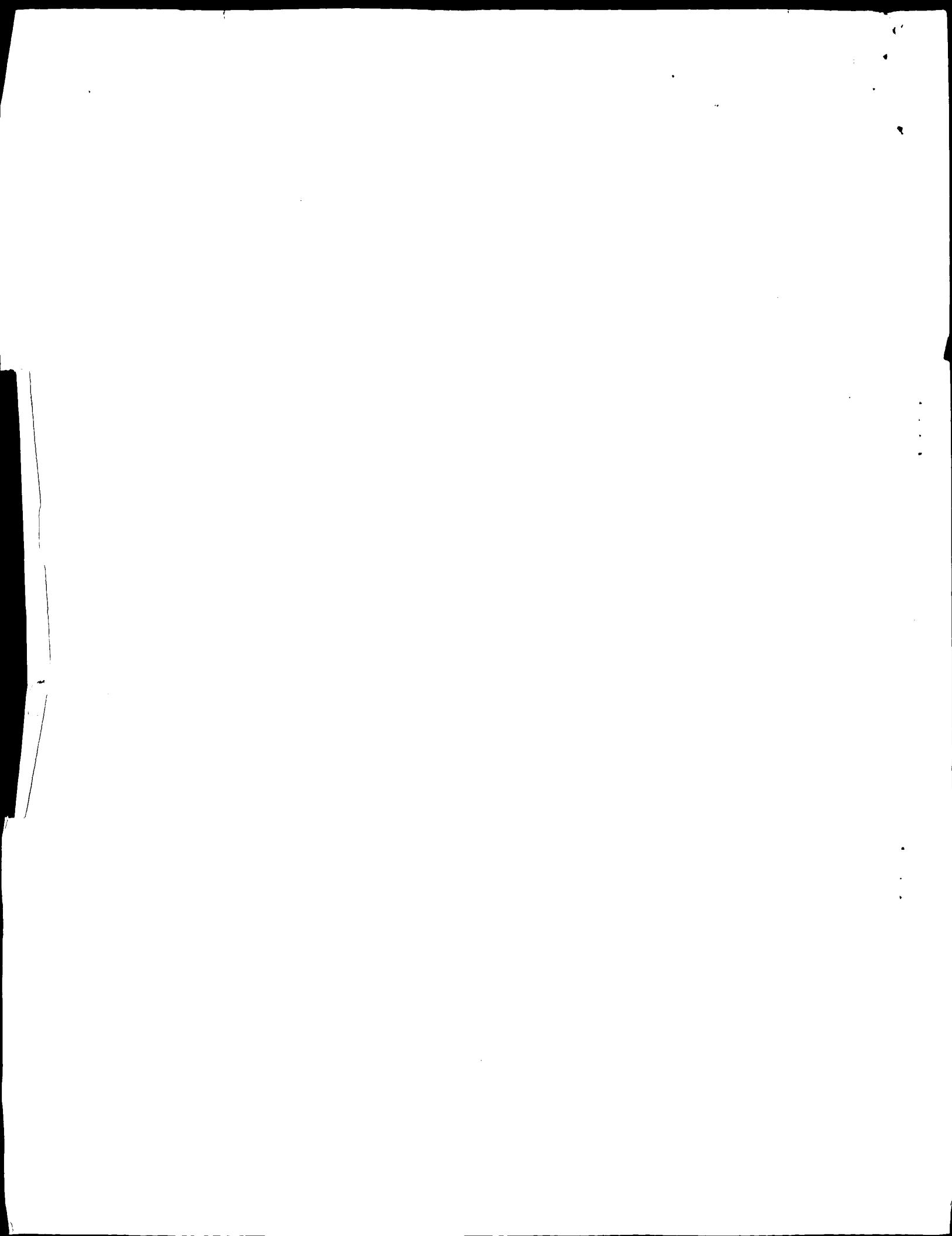
Mailed: **January 16, 2001** via "Express Mail Label # **EL742666289US**

I hereby certify that the Provisional Application for the above-referenced application is being deposited with the United States Postal Service "Express Mail Post Office to Addressee" service under 37 C.F.R. 1.10 on the date indicated above and is addressed to:

BOX PATENT APPLICATION
Assistant Commissioner for Patents
Washington, D.C. 20231

Charles Jackson
(Type/printed name of person mailing paper or fee)

Charles Jackson
Signature





INPI
INSTITUT
NATIONAL DE
LA PROPRIETE
INDUSTRIELLE
01/16/01
09/760574
U.S. PRO
JC066



BREVET D'INVENTION

CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION

COPIE OFFICIELLE

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

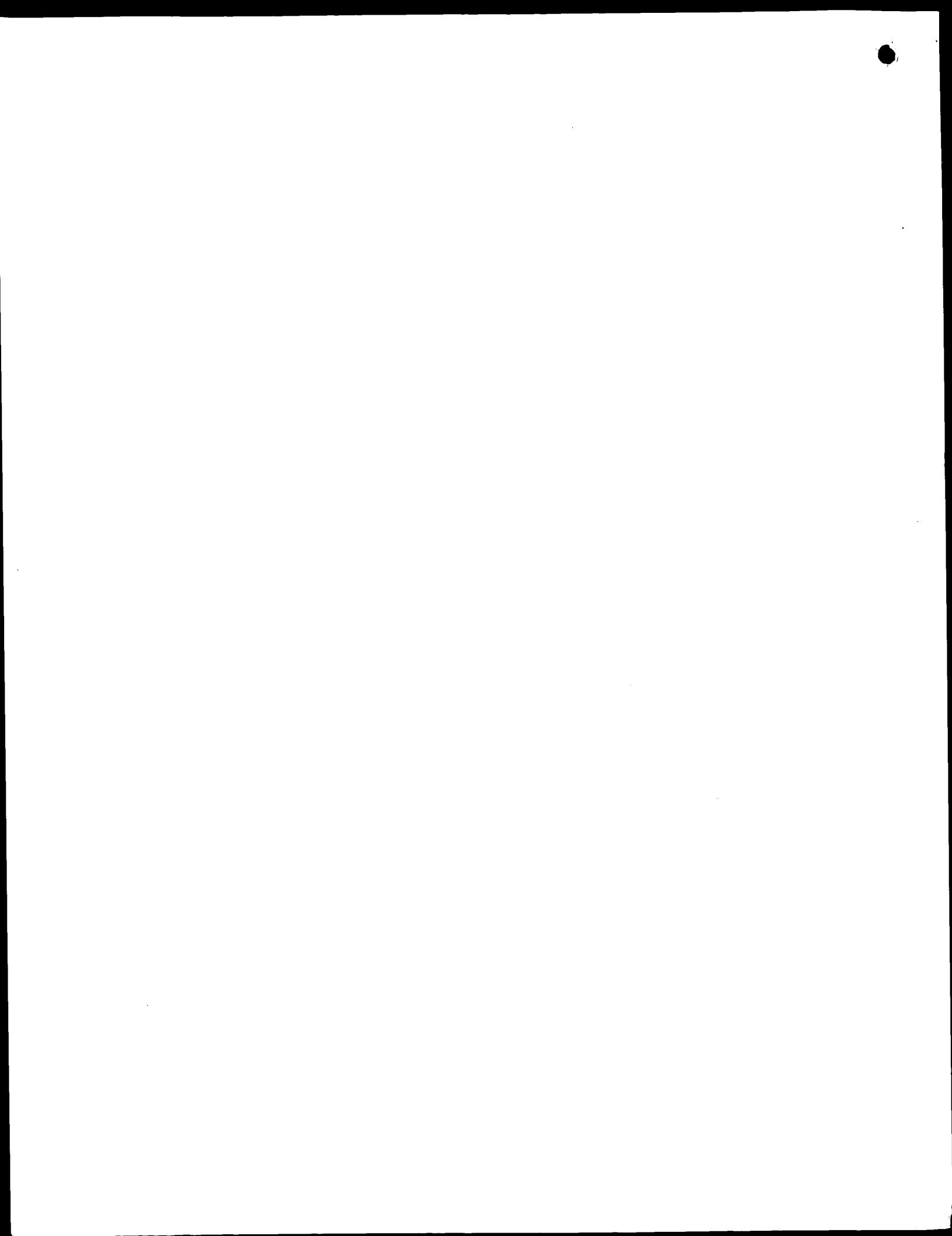
Fait à Paris, le 29 DEC. 2000

Pour le Directeur général de l'Institut
national de la propriété industrielle
Le Chef du Département des brevets

Martine PLANCHE

INSTITUT
NATIONAL DE
LA PROPRIETE
INDUSTRIELLE

SIEGE
26 bis, rue de Saint Petersbourg
75800 PARIS cedex 08
Téléphone : 01 53 04 53 04
Télécopie : 01 42 93 59 30
<http://www.inpi.fr>





INSTITUT
NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ
INDUSTRIELLE

26 bis, rue de Saint Pétersbourg
75800 Paris Cedex 08
Téléphone : 01 53 04 53 04 Télécopie : 01 42 94 86 54

BREVET D'INVENTION

CERTIFICAT D'UTILITÉ

Code de la propriété intellectuelle - Livre VI

cerfa

N° 11354*01

REQUÊTE EN DÉLIVRANCE 1/2

Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

DB 540 W/260399

<p>REMISE DES PIÈCES DATE 21 JAN 2000 LIEU 69 INPI LYON</p> <p>N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI 0000798 DATE DE DÉPÔT ATTRIBUÉE PAR L'INPI 21 JAN. 2000</p> <p>Vos références pour ce dossier (facultatif) AC/DL BFF 00/0023</p>		<p>Réserve à l'INPI</p> <p>1 NOM ET ADRESSE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE À QUI LA CORRESPONDANCE DOIT ÊTRE ADRESSÉE</p> <p>Cabinet LAVOIX 2 Place d'Estienne d'Orves 75441 PARIS CEDEX 09</p>										
<p>Confirmation d'un dépôt par télécopie <input type="checkbox"/> N° attribué par l'INPI à la télécopie</p> <p>2 NATURE DE LA DEMANDE Cochez l'une des 4 cases suivantes</p> <table border="1"> <tr> <td>Demande de brevet</td> <td><input checked="" type="checkbox"/></td> </tr> <tr> <td>Demande de certificat d'utilité</td> <td><input type="checkbox"/></td> </tr> <tr> <td>Demande divisionnaire</td> <td><input type="checkbox"/></td> </tr> <tr> <td>Demande de brevet initiale ou demande de certificat d'utilité initiale</td> <td><input type="checkbox"/> N° _____ Date / / <input type="checkbox"/> N° _____ Date / /</td> </tr> <tr> <td>Transformation d'une demande de brevet européen Demande de brevet initiale</td> <td><input type="checkbox"/> N° _____ Date / /</td> </tr> </table> <p>3 TITRE DE L'INVENTION (200 caractères ou espaces maximum)</p> <p>Vaccins ADN améliorés pour animaux de rente</p>			Demande de brevet	<input checked="" type="checkbox"/>	Demande de certificat d'utilité	<input type="checkbox"/>	Demande divisionnaire	<input type="checkbox"/>	Demande de brevet initiale ou demande de certificat d'utilité initiale	<input type="checkbox"/> N° _____ Date / / <input type="checkbox"/> N° _____ Date / /	Transformation d'une demande de brevet européen Demande de brevet initiale	<input type="checkbox"/> N° _____ Date / /
Demande de brevet	<input checked="" type="checkbox"/>											
Demande de certificat d'utilité	<input type="checkbox"/>											
Demande divisionnaire	<input type="checkbox"/>											
Demande de brevet initiale ou demande de certificat d'utilité initiale	<input type="checkbox"/> N° _____ Date / / <input type="checkbox"/> N° _____ Date / /											
Transformation d'une demande de brevet européen Demande de brevet initiale	<input type="checkbox"/> N° _____ Date / /											
<p>4 DÉCLARATION DE PRIORITÉ OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE LA DATE DE DÉPÔT D'UNE DEMANDE ANTÉRIEURE FRANÇAISE</p>		<p>Pays ou organisation Date / / N°</p> <p>Pays ou organisation Date / / N°</p> <p>Pays ou organisation Date / / N°</p> <p><input type="checkbox"/> S'il y a d'autres priorités, cochez la case et utilisez l'imprimé « Suite »</p>										
<p>5 DEMANDEUR</p> <p>Nom ou dénomination sociale MERIAL</p> <p>Prénoms</p> <p>Forme juridique</p> <p>N° SIREN</p> <p>Code APE-NAF</p>		<p><input type="checkbox"/> S'il y a d'autres demandeurs, cochez la case et utilisez l'imprimé « Suite »</p>										
Adresse	Rue 17 Rue Bourgelat											
	Code postal et ville 69002 LYON											
Pays FRANCE												
Nationalité FRANÇAISE												
N° de téléphone (facultatif)												
N° de télécopie (facultatif)												
Adresse électronique (facultatif)												

**BREVET D'INVENTION
CERTIFICAT D'UTILITÉ**

REQUÊTE EN DÉLIVRANCE 2/2

Réservé à l'INPI			
REMISE DES PIÈCES			
DATE	21 JAN 2000		
LIEU	69 INPI LYON		
N° D'ENREGISTREMENT			
NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI	0000798		
DB 540 W / 260899			
Vos références pour ce dossier : (facultatif)			
AC/DL BFF 00/0023			
6 MANDATAIRE			
Nom			
Prénom			
Cabinet ou Société			
Cabinet LAVOIX			
N° de pouvoir permanent et/ou de lien contractuel			
Adresse	Rue	2 Place d'Estienne d'Orves	
	Code postal et ville	75441	PARIS
N° de téléphone (facultatif)		01 53 20 14 20	
N° de télécopie (facultatif)			
Adresse électronique (facultatif)			
7 INVENTEUR (S)			
Les inventeurs sont les demandeurs			
<input type="checkbox"/> Oui <input checked="" type="checkbox"/> Non Dans ce cas fournir une désignation d'inventeur(s) séparée			
8 RAPPORT DE RECHERCHE			
Établissement immédiat ou établissement différé			
<input checked="" type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>			
Paiement échelonné de la redevance			
<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>			
9 RÉDUCTION DU TAUX DES REDEVANCES			
<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>			
Si vous avez utilisé l'imprimé «Suite», indiquez le nombre de pages jointes			
10 SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE (Nom et qualité du signataire)			
Cabinet LAVOIX Mandataire Alain COLOMBET CPI N° 95-0306 			
VISA DE LA PRÉFECTURE OU DE L'INPI			
			

DÉPARTEMENT DES BREVETS

26 bis. rue de Saint Pétersbourg
75800 Paris Cedex 08
Téléphone : 01 53 04 53 04 Télécopie : 01 42 94 86 54

DÉSIGNATION D'INVENTEUR(S) Page N° 1/1

(Si le demandeur n'est pas l'inventeur ou l'unique inventeur)

Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

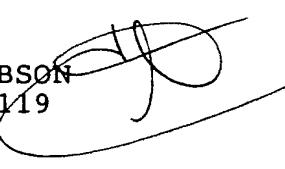
05 113 W - 26095

Vos références pour ce dossier (facultatif)	BFF 00/0023
N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL	00 00798
TITRE DE L'INVENTION (200 caractères ou espaces maximum)	
Vaccins ADN améliorés pour animaux de rente.	

LE(S) DEMANDEUR(S) :

MERIAL

DESIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S) : (Indiquez en haut à droite «Page N° 1/1» S'il y a plus de trois inventeurs, utilisez un formulaire identique et numérotez chaque page en indiquant le nombre total de pages).

Nom		AUDONNET Jean-Christophe, Francis	
Prénoms			
Adresse	Rue	119, rue de Créqui 69006 LYON FRANCE	
	Code postal et ville		
Société d'appartenance (facultatif)			
Nom		FISCHER Laurent, Bernard	
Prénoms			
Adresse	Rue	3ter rue Saint Gervais 69008 LYON FRANCE	
	Code postal et ville		
Société d'appartenance (facultatif)			
Nom		BARZU-LE-ROUX Simona	
Prénoms			
Adresse	Rue	461 route de Saint Bel 69210 LENTILLY FRANCE	
	Code postal et ville		
Société d'appartenance (facultatif)			
DATE ET SIGNATURE(S) DU (DES) DEMANDEUR(S) OU DU MANDATAIRE (Nom et qualité du signataire)		Paris, le 15 mars 2000	
		 C. JACOBSON n° 92.1119	

DOCUMENT COMPORTANT DES MODIFICATIONS

PAGE(S) DE LA DESCRIPTION OU DES REVENDICATIONS OU PLANCHE(S) DE DESSIN			R.M.*	DATE DE LA CORRESPONDANCE	TAMPON DATEUR DU CORRECTEUR
Modifiée(s)	Supprimée(s)	Ajoutée(s)			
1.21, 72			X	06.07.00	19 JUIL. 2000 - V D

Un changement apporté à la rédaction des revendications d'origine, sauf si celui-ci découle des dispositions de l'article R.612-36 du code de la Propriété Intellectuelle, est signalé par la mention «R.M.» (revendications modifiées).

1
La présente invention a trait à des vaccins ADN améliorés pour les animaux de rente, en particulier bovins et porcins.

L'utilisation de molécules d'acide désoxyribonucléique (ADN) pour la vaccination est connue depuis le début des années 90 (Wolf *et al.* *Science* 1990. 247. 1465-1468). Cette technique de vaccination induit une immunité cellulaire et humorale après la transfection *in vivo* de cellules du sujet à vacciner par des molécules d'ADN ou d'ARN codant pour des protéines immunologiquement actives.

Un vaccin ADN se compose d'au moins un plasmide pouvant être exprimé par la machinerie cellulaire du sujet à vacciner et d'un véhicule ou d'un excipient pharmaceutiquement acceptable. La séquence nucléotidique de ce plasmide code pour, entre autres, un ou plusieurs immunogènes, tels que des protéines ou glycoprotéines capables d'induire, chez le sujet à vacciner, une réponse immunitaire cellulaire (mobilisation des lymphocytes T) et humorale (stimulation de la production d'anticorps spécifiquement dirigés contre l'immunogène) (Davis H. L. *Current Opinion Biotech.* 1997. 8. 635-640).

Tous les immunogènes provenant d'un pathogène ne sont pas des antigènes assez efficaces naturellement pour induire une réponse immunitaire protectrice optimale chez l'animal à vacciner. Il est donc nécessaire d'améliorer la réponse immunitaire.

Différentes voies d'administration du vaccin ADN sont proposées (intrapéritonéale, intraveineuse, intramusculaire, sous-cutanée, intradermique, muqueuse, etc.). Différents moyens d'administration ont également été proposés, notamment des particules d'or enrobées d'ADN et projetées de façon à pénétrer dans les cellules de la peau du sujet à vacciner (Tang *et al.* *Nature* 1992. 356. 152-154) et les injecteurs par jet liquide permettant de transfecter à la fois des cellules de la peau et des cellules des tissus sous-jacents (Furth *et al.* *Analytical Bioch.* 1992. 205. 365-368).

Des composés chimiques ont été utilisés pour la transfection *in vitro* d'ADN :

A/ - les lipides cationiques.

Les lipides cationiques sont eux-mêmes divisés en quatre sous-groupes.

1) les lipides cationiques contenant des sels d'ammonium quaternaire, comme par exemple le DOTMA (dioléoyloxypropyl-triméthylammonium, produit par Gibco sous le nom de Lipofectine), le DOTAP (triméthyl-2,3-(octadéc-9-ène-oyloxy)-1-

5 propanammonium ; Gregoriadis *et al.* FEBS Letters 1997. **402**. 107-110), le DMRIE (N-(2-hydroxyéthyl)-N,N-diméthyl-2,3-bis(tetradécyloxy)-1-propanaminium ; WO-A-9634109), le DLRIE (N-(2-hydroxyéthyl)-N,N-diméthyl-2,3-bis(dodécyloxy)-1-propanaminium ; Felgner *et al.* Ann. N Y Acad. Sci. 1995.

772. 126-139).

10 Ces lipides cationiques contenant des sels d'ammonium quaternaire peuvent être associés ou non avec un lipide neutre supplémentaire, tel que le DOPC (dioléoyl-phosphatidyl-choline) ou le DOPE (dioléoyl-phosphatidyl-éthanolamine) (J.P. Behr, Bioconjugate Chemistry 1994. **5**. 382-389).

2) les lipoamines, comme par exemple le DOGS

15 (dioctadécylamidoglycylspermine, produit par Promega sous le nom de Transfectam ; Abdallah *et al.* Biol. Cell. 1995. **85**. 1-7), le DC-Chol (diméthylaminoéthane-carbamoyl-cholestérol ; Gao et Huang, Biochem. Biophys. Res. Commun. 1991. **179**. 280-285), le BGSC (bis-guanidine-spermidine-cholestérol), le BGTC (bis-guanidine-tren-cholestérol) (Vigneron *et al.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1996. **93**. 9682-9686).

20 3) les lipides cationiques contenant des sels d'ammonium quaternaire et des lipoamines, comme par exemple le DOSPA (N,N-diméthyl-N-(2-(sperminecarboxamido)éthyl)-2,3-bis(dioléoyloxy)-1-propanimidium pentahydrochloride, commercialisé par Gibco sous le nom de LipofectAmine® ;

25 Hawley-Nelson *et al.* Focus 1993. **15**. 73-79), le GAP-DLRIE (N-(3-aminopropyl)-N,N-diméthyl-2,3-bis(dodécyloxy)-1-propanaminium ; Wheeler *et al.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1996. **93**. 11454-11459 ; Norman *et al.* Vacine 1997. **15**. 801-803).

30 4) les lipides contenant des sels d'amidine, comme par exemple l'ADPDE,

l'ADODE (Ruysschaert *et al.* Biochem. Biophys. Res. Commun. 1994. **203**. 1622-1628).

B/ - les polymères, comme par exemple le SuperFectTM (molécules de dendrimères activés, produits par Qiagen ; Xu *et al.* Mol. Genet. Metab. 1998.

64. 193-197), et

5 C/ - les agents biochimiques, comme par exemple les toxines, notamment les toxines cholériques.

Certains de ces composés ont aussi été utilisés dans la formulation de vaccins ADN avec des résultats plus que mitigés. Les connaissances en matière de transfection *in vitro* ne sont pas transposables à la vaccination ADN où l'objectif final est d'assurer une réaction immunitaire protectrice. Des effets 10 négatifs sur l'induction d'une protection immunitaire efficace ont même été constatés avec des composés connus pour favoriser la transfection *in vitro*. Certains composés chimiques de formulation sont toxiques à hautes doses pour les cellules transfectées.

Dans les travaux de Etchart (Etchart *et al.* J. Gen. Virol. 1997. 78. 1577-1580), l'utilisation du DOTAP n'a pas eu d'effet adjuvant lors de l'administration 15 du vaccin ADN par la voie intranasale, alors qu'il en a eu par la voie orale. Le DOTAP a également été utilisé dans des vaccins ADN codant pour l'hémagglutinine (HA) du virus de la grippe sur le modèle souris administrés par la voie intranasale (Ban *et al.* Vaccine 1997. 15. 811-813), mais l'addition de 20 DOTAP a inhibé la réponse immunitaire. L'utilisation de DC-Chol ou de DOTAP/DOPE dans des vaccins ADN codant pour la protéine de surface (S) du virus de l'hépatite B sur le modèle souris administrés par la voie intramusculaire a permis d'augmenter la réponse en anticorps; alors que l'utilisation de la Lipofectine (ou DOTMA) n'a pas augmenté cette réponse (Gregoriadis *et al.* 25 FEBS Letters 1997. 402. 107-110). Le DC-Chol/DOPE a également été utilisé dans des vaccins ADN contre le virus de l'immunodéficience humaine (HIV, protéine Env) sur le modèle souris, dont l'administration par la voie intramusculaire a induit une réponse immunitaire plus efficace, alors que l'administration par la voie sous-cutanée ou intradermique ne l'a pas augmentée 30 (Ishii *et al.* AIDS Res. Hum. Retro. 1997. 13. 1421-1428).

L'addition de certaines cytokines, notamment d'interleukines ou d'interférons, peut permettre d'améliorer la réponse immunitaire induite en particulier par les vaccins ADN. Chaque cytokine déclenche une réaction qui lui est propre et oriente plus ou moins la réponse immunitaire vers une réponse cellulaire ou vers une réponse humorale (Pasquini *et al.* Immunol. Cell. Biol. 1997. **75**. 397-401 ; Kim *et al.* J. Interferon Cytokine Res. 1999. **19**. 77-84). Les effets adjuvants d'une cytokine provenant d'une espèce donnée ne sont pas nécessairement les mêmes si le contexte immunitaire varie, notamment si cette cytokine est administrée à une autre espèce, donc dans un système immunitaire hétérologue. L'addition de cytokine peut également n'avoir aucun effet adjuvant, voire aboutir à une inversion de l'effet recherché, c'est-à-dire une diminution ou une inhibition de la réponse immunitaire. Ainsi, un vaccin ADN codant pour une chaîne simple d'une immunoglobuline fusionnée avec le GM-CSF n'augmente pas la réponse immunitaire, alors que l'administration directe chez la souris de cette protéine de fusion est efficace, tout comme l'est l'administration d'une protéine de fusion formée de Fv et de la cytokine IL-1bêta ou l'administration d'un vaccin ADN codant pour cette dernière protéine de fusion (Hakim *et al.* J. Immunol 1996. **157**. 5503-5511). L'utilisation de plasmides co-exprimant la cytokine IL-2 et la protéine d'enveloppe du virus de l'hépatite B dans une conformation fusionnée ou non fusionnée aboutit à l'augmentation des réponses immunitaires humorales et cellulaires (Chow *et al.* J. Virol. 1997. **71**. 169-78). Mais l'utilisation d'un plasmide bicistronique codant pour la glycoprotéine gp120 du virus de l'immunodéficience acquise humaine (HIV-1) et la cytokine IL-2 a induit une réponse immunitaire spécifique anti-gp120 plus faible que celle obtenue par l'utilisation d'un plasmide monocistronique codant uniquement pour gp120 (Barouch *et al.* J. Immunol 1998. **161**. 1875-1882). La co-injection chez la souris de deux vecteurs d'expression, l'un codant pour la glycoprotéine G du virus de la rage, l'autre pour le GM-CSF murin stimule l'activité des lymphocytes B et T, alors que la co-injection avec un plasmide codant pour l'interféron gamma (à la place du GM-CSF murin) a pour résultat une diminution de la réponse immunitaire (Xiang *et al.* Immunity 1995. **2**. 129-135).

Certaines modifications au niveau des antigènes, telles que les délétions d'une partie de la séquence nucléotidique codant pour l'antigène, les insertions d'un fragment d'ADN dans la séquence nucléotidique codant pour l'antigène ou dans les régions non traduites en amont ou en aval, peuvent également 5 améliorer l'efficacité des vaccins ADN, notamment en améliorant le niveau d'expression de l'antigène ou sa présentation.

Mais en pratique, les manipulations au niveau de la séquence nucléotidique codant pour l'antigène peuvent entraîner une diminution ou la perte de l'activité immunologique initiale. Ainsi, la délétion du domaine 10 transmembranaire dans le gène codant pour l'antigène G du virus de la rage a diminué le niveau de protection induit chez le modèle souris après administration par la voie intramusculaire d'un vaccin ADN codant pour cet antigène modifié (Xiang *et al.* Virol. 1995. **209**. 569). La délétion du domaine transmembranaire dans le gène codant pour la glycoprotéine gD du virus herpès bovin (BHV) n'a 15 pas permis d'augmenter la réponse en anticorps et n'a induit qu'une protection partielle chez les bovins vaccinés par la voie intramusculaire (van Drunen Little- van den Hurk *et al.* J. Gen. Virol. 1998. **79**. 831-839). Les réponses immunitaires humorales et cellulaires et la protection conférée sont identiques chez des 20 cobayes éprouvés après avoir été immunisés à l'aide soit d'un vaccin ADN codant pour la glycoprotéine GP du virus Ebola, soit d'un vaccin ADN codant pour cette glycoprotéine GP mais sous une forme sécrétée (Xu *et al.* Nature Medicine 1998. **4**. 37-42).

L'insertion de la séquence signal de l'activateur du plasminogène tissulaire humain (en anglais human tissue Plasminogen Activator ou human 25 tPA) dans le gène codant pour l'antigène Pf332 de la malaria n'a pas permis d'augmenter la réponse en anticorps chez la souris vaccinée par voie intramusculaire (Haddad *et al.* FEMS 1997. **18**. 193-202). L'addition en phase d'une séquence tPA au gène codant pour l'antigène VP7 du rotavirus murin n'a 30 pas également permis d'augmenter la réponse en anticorps chez la souris vaccinée par voie intradermique, alors que la protéine de fusion formée de

l'antigène VP4 et du tPA a permis cette augmentation, mais sans induire une protection efficace (Choi *et al.* Virology 1998. **250**. 230-240).

Les modifications effectuées sur la séquence nucléotidique d'un antigène ne peuvent pas en général être directement transposées à un autre antigène, car
5 les antigènes n'ont pas toujours les mêmes agencements structuraux.

La déposante a pour objectif l'amélioration de l'efficacité de la vaccination ADN. Elle a en particulier pour objectif d'obtenir une meilleure réponse immunitaire et notamment une protection efficace chez les animaux de rente,
10 notamment chez les bovins et les porcins, par la vaccination ADN.

La déposante a pour objectif l'élaboration de vaccins ADN améliorés induisant une réponse immunitaire efficace et protectrice contre le virus herpès bovin de type 1 (BHV-1) encore appelé virus de la rhinotrachéite infectieuse bovine (IBR), le virus respiratoire syncitial bovin (BRSV), le virus de la maladie
15 des muqueuses ou pestivirus bovin de type 1 ou de type 2 (bovine viral diarrhea virus ou BVDV-1 et BVDV-2), le virus parainfluenza de type 3 (bPI-3) chez les bovins.

La déposante a pour objectif l'élaboration de vaccins ADN améliorés induisant une réponse immunitaire efficace et protectrice comprenant au moins
20 une valence choisie parmi le groupe formé par le virus herpès porcin ou virus de la maladie d'Aujeszky (Pseudorabies virus ou PRV), le virus du syndrome respiratoire et reproducteur porcin (porcine reproductive respiratory syndrome ou PRRSV), le virus de la grippe porcine (swine influenza virus ou SIV), virus de la peste porcine classique (Hog Cholera Virus ou HCV), parvovirus chez les
25 porcins.

La déposante a également pour objectif l'élaboration de vaccins ADN améliorés permettant d'obtenir une protection immunitaire efficace et protectrice chez le bovin, comprenant au moins une valence choisie parmi le groupe formé des virus BHV-1, BRSV, BVDV, bPI-3 et la rage.

30 L'invention a pour objet des vaccins ADN améliorés permettant d'obtenir une protection efficace contre au moins un pathogène infectant les animaux de

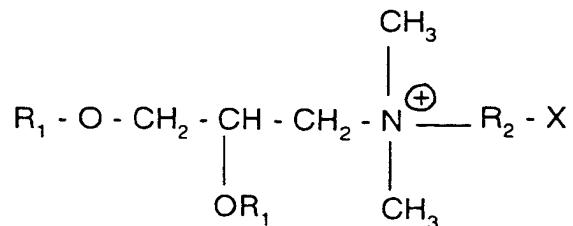
rente, notamment les bovins et les porcins. Le vaccin ADN est amélioré : soit par sa formulation, soit par l'addition de GM-CSF, soit par l'optimisation du ou des antigènes, soit par des combinaisons de ces solutions.

5 De préférence, le vaccin ADN est amélioré par sa formulation, et facultativement soit par l'addition de GM-CSF, soit par l'optimisation du ou des antigènes, enfin soit par l'addition de GM-CSF et par l'optimisation du ou des antigènes.

10 Par définition, le vaccin ADN comprend comme principe actif un plasmide codant pour et exprimant un gène ou fragment de gène. Le terme plasmide recouvre une unité de transcription ADN comprenant une séquence polynucléotidique comprenant la séquence du gène à exprimer et les éléments nécessaires à son expression *in vivo*. On préfère la forme plasmide circulaire, super enroulée ou non. La forme linéaire entre également dans le cadre de cette invention.

15 Chaque plasmide comprend un promoteur apte à assurer, dans les cellules hôtes, l'expression du gène inséré sous sa dépendance. Il s'agit en général d'un promoteur eucaryote fort et en particulier d'un promoteur précoce du cytomégalovirus CMV-IE, d'origine humaine ou murine, ou encore éventuellement d'une autre origine telle que rat, cobaye. De manière plus 20 générale, le promoteur est soit d'origine virale, soit d'origine cellulaire. Comme promoteur viral autre que CMV-IE, on peut citer le promoteur précoce ou tardif du virus SV40 ou le promoteur LTR du virus du Sarcome de Rous. Il peut aussi s'agir d'un promoteur de virus dont provient le gène, par exemple le promoteur propre du gène. Comme promoteur cellulaire, on peut citer le promoteur d'un 25 gène du cytosquelette, tel que par exemple le promoteur de la desmine, ou encore le promoteur de l'actine. Lorsque plusieurs gènes sont présents dans le même plasmide, ceux-ci peuvent être présentés dans la même unité de transcription ou dans plusieurs unités différentes.

Suivant une première modalité, les vaccins ADN selon l'invention sont formulés par addition à titre d'adjuvant, de lipides cationiques contenant un sel d'ammonium quaternaire, de formule :



5 dans laquelle R1 est un radical aliphatique linéaire, saturé ou insaturé, ayant 12 à 18 atomes de carbone, R2 est un autre radical aliphatique, renfermant 2 ou 3 atomes de carbone, et X un groupement hydroxyle ou amine.

De préférence il s'agit du DMRIE, de préférence associé avec un lipide neutre, notamment le DOPE, pour former le DMRIE-DOPE.

10 La présente invention a donc pour objet un vaccin ADN contre au moins un pathogène touchant les animaux de rente, notamment les bovins ou les porcins, comprenant au moins un plasmide contenant au moins une séquence nucléotidique codant pour un immunogène d'un pathogène de l'espèce animale considérée, dans des conditions permettent l'expression *in vivo* de cette 15 séquence, et un lipide cationique contenant un sel d'ammonium quaternaire, notamment le DMRIE, de préférence associé au DOPE.

20 De préférence, le mélange vecteur recombinant avec cet adjuvant se fait de manière extemporanée et l'on préfère, avant son administration à l'animal, laisser le temps au mélange ainsi constitué de se complexer, par exemple pendant une durée allant de 10 à 60 minutes, notamment de l'ordre de 30 minutes.

Lorsque du DOPE est présent, le ratio molaire DMRIE : DOPE va de préférence de 95 : 5 à 5 : 95, plus particulièrement de 1 : 1.

25 Le ratio pondéral plasmide : adjuvant DMRIE ou DMRIE-DOPE peut aller notamment de 50 : 1 à 1 : 10, notamment de 10 : 1 à 1 : 5, de préférence de 1 : 1 à 1 : 2.

Suivant une deuxième modalité, on ajoute aux vaccins selon l'invention le GM-CSF (en anglais Granulocyte macrophage - colony stimulating factor ; Clark S. C. *et al.* Science 1987. **230**. 1229 ; Grant S. M. *et al.* Drugs 1992. **53**. 516), ce qui peut se faire par l'incorporation de protéine GM-CSF directement dans la 5 composition vaccinale ou de préférence par l'insertion de la séquence nucléotidique codant pour le GM-CSF dans un vecteur d'expression dans des conditions permettant son expression *in vivo*. Comme vecteur d'expression, on préfère utiliser un plasmide, e.g. le plasmide contenant la séquence nucléotidique codant pour le (ou les) antigène(s) d'intérêt ou un autre plasmide. 10 Le choix du GM-CSF se fait en fonction de l'espèce animale à vacciner, ainsi pour les bovins le GM-CSF bovin est utilisé, pour les porcs il s'agit du GM-CSF porcin.

Suivant une troisième modalité, la (ou les) séquence nucléotidique codant pour l'immunogène sont sous une forme optimisée. Par optimisation, on entend 15 toute modification de la séquence nucléotidique, notamment se manifestant au moins par un niveau d'expression plus élevé de cette séquence nucléotidique, et/ou par une augmentation de la stabilité de l'ARN messager codant pour cet antigène, et/ou par la sécrétion provoquée de cet antigène dans le milieu extracellulaire, et ayant pour conséquence directe ou indirecte une augmentation 20 de la réponse immunitaire induite.

Dans la présente invention, l'optimisation de l'antigène d'intérêt consiste de préférence en la délétion du fragment de la séquence nucléotidique codant pour le domaine transmembranaire de l'antigène d'intérêt (par délétion, on entend la délétion totale ou une délétion partielle suffisante pour que le domaine 25 transmembranaire ne soit plus, ou substantiellement plus, fonctionnel), et/ou en l'addition en phase d'une séquence nucléotidique codant pour le signal tPA (Montgomery *et al.* Cell. Mol. Biol. 1997. **43**. 285-292 ; Harris *et al.* Mol. Biol. Med 1986. **3**. 279-292), et/ou en l'insertion d'intron stabilisateur en amont du gène à exprimer. La délétion du fragment d'ADN codant pour le domaine transmembranaire de l'antigène d'intérêt favorise la sécrétion vers le milieu 30 extracellulaire des antigènes ainsi tronqués et ainsi augmente leurs possibilités

de contact avec les cellules du système immunitaire. L'insertion de la séquence nucléotidique codant pour le signal tPA facilite la traductibilité de l'ARN messager auquel le signal tPA est joint, et augmente ainsi le niveau d'expression de cet ARN messager et donc la production d'antigènes. Le signal tPA joue aussi un rôle dans la sécrétion de l'antigène synthétisé.

D'autres séquences nucléotidiques codant pour des peptides signaux peuvent être utilisées, notamment celles du peptide signal de la mélittine provenant des abeilles (Sisk W. P. *et al.*, 1994, *J. Virol.*, **68**, 766-775).

L'insertion d'un intron stabilisateur dans le gène codant pour l'antigène d'intérêt évite les épissages aberrants de son ARN messager et maintient l'intégrité physique de ce dernier.

De préférence le signal tPA est d'origine humaine. La séquence nucléotidique du signal tPA humain est accessible auprès de la base de données GenBank sous le numéro d'accès NM_000930. De préférence, l'intron est l'intron II du gène de la bêta-globine du lapin (van Ooyen *et al.* *Science* 1979. **206**, 337-344), dont la séquence nucléotidique est accessible auprès de la base de données GenBank sous le numéro d'accès V00882 et référencée sous intron n°2.

La présente invention a pour objet un vaccin ADN amélioré capable d'induire une réponse immunitaire efficace et protectrice chez les bovins contre la rhinotrachéite infectieuse bovine (IBR).

Le virus responsable de la rhinotrachéite infectieuse bovine est un virus herpès bovin de type 1 (BHV-1), membre de la famille des *Alphaherpesvirinae* (Babiuk L. A. *et al.* 1996. *Vet. Microbiol.* **53**, 31-42). Des séquences nucléotidiques codant pour les glycoprotéines gB, gC et gD, sont connues et accessibles auprès de la base de données GenBank sous le numéro d'accès AJ004801.

Selon l'invention, le vaccin ADN contre IBR est de préférence amélioré par sa formulation avec un adjuvant selon l'invention, notamment le DMRIE, de préférence le DMRIE-DOPE. Facultativement, cela peut être combiné avec soit

l'addition de GM-CSF bovin (Maliszewski *et al.* Molec. Immunol. 1988. **25**. 843-850), soit l'optimisation d'au moins un antigène de IBR, enfin soit l'addition de GM-CSF bovin et l'optimisation d'au moins un antigène de IBR.

Une séquence nucléotidique codant pour le GM-CSF bovin est accessible 5 auprès de la base de données GenBank sous le numéro d'accès U22385.

L'addition de GM-CSF bovin peut se faire par l'incorporation du polypeptide GM-CSF bovin dans la composition vaccinale ou de préférence par l'insertion de la séquence nucléotidique codant pour le GM-CSF bovin dans un vecteur d'expression *in vivo*, de préférence un plasmide. De préférence, la 10 séquence nucléotidique codant pour le GM-CSF bovin est insérée dans un deuxième plasmide d'expression (e.g. pLF1032 exemple 13), différent de celui (ou de ceux) dans lequel est inséré le ou les gènes codant pour le ou les antigènes de IBR.

L'optimisation des antigènes issus de IBR se fait par substitution, par une 15 séquence " signal ", notamment celle du signal tPA d'origine humaine (GenBank numéro d'accès NM_000930), de la séquence du peptide signal de la glycoprotéine gB et/ou de la glycoprotéine gC et/ou de la glycoprotéine gD, et/ou par la délétion du fragment d'ADN codant pour le domaine transmembranaire de gB et/ou de gC et/ou de gD. La délétion du fragment d'ADN codant pour le 20 domaine transmembranaire d'une de ces glycoprotéines s'accompagne de préférence de la partie C terminale contiguë (portion cytoplasmique de la glycoprotéine). Le vaccin ADN contre IBR selon l'invention peut donc coder et exprimer un seul antigène d'IBR optimisé (gB, gC ou gD) ou deux d'entre eux ou les trois, c'est-à-dire gB optimisé, gC optimisé et gD optimisé.

25 Des séquences nucléotidiques codant pour les antigènes de BHV-1 utilisables dans la présente invention et différentes constructions de vecteurs d'expression sont données dans les exemples annexés et dans FR-A1-2751229, notamment dans les exemples 7 et 8, et dans les figures 3 et 4.

30 De manière préférentielle selon l'invention, le vaccin ADN contre BHV-1 est formulé avec du DMRIE-DOPE, et est composé d'un plasmide d'expression (e.g. pPB281, exemple 3.1.2) codant pour l'antigène gB de BHV-1 optimisé par

la délétion du fragment de la séquence nucléotidique codant pour le domaine transmembranaire et la partie C terminale contiguë, d'un deuxième plasmide d'expression (e.g. pPB292, exemple 3.2.2) codant pour l'antigène gC de BHV-1 optimisé par la délétion du fragment de la séquence nucléotidique codant pour le 5 domaine transmembranaire et la partie C terminale contiguë, et d'un troisième plasmide d'expression (e.g. pPB284, exemple 3.3.2) codant pour l'antigène gD de BHV-1 optimisé par la délétion du fragment de la séquence nucléotidique codant pour le domaine transmembranaire et la partie C terminale contiguë.

De manière générale, et pas seulement pour BHV-1, la partie C terminale 10 contiguë à la séquence codant pour le domaine transmembranaire peut être conservée. Il est toutefois souvent plus aisé de la déléter en même temps que la séquence codant pour le domaine transmembranaire.

La présente invention a aussi pour objet un vaccin ADN amélioré capable 15 d'induire une réponse immunitaire efficace et protectrice chez les bovins contre le virus respiratoire syncitial bovin (BRSV).

Le virus BRSV est un Paramyxovirus, membre également de la famille des *Paramyxoviridae* (Baker *et al.* Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract. 1997. 13. 425-454). Des séquences nucléotidiques codant pour la protéine F et la 20 glycoprotéine G sont connues et accessibles auprès de la base de données GenBank respectivement sous le numéro d'accès Y17970 et U33539.

Le vaccin ADN contre BRSV est de préférence formulé avec un adjuvant selon l'invention, notamment le DMRIE, de préférence le DMRIE-DOPE. Ceci peut être facultativement combiné avec soit l'addition de GM-CSF bovin, soit l'optimisation d'au moins un antigène de BRSV, enfin soit l'addition de GM-CSF 25 bovin et l'optimisation d'au moins un antigène de BRSV.

L'addition de GM-CSF bovin peut se faire comme cela est décrit pour BHV-1.

L'optimisation des antigènes issus de BRSV se fait par substitution, par 30 une séquence " signal ", notamment celle du tPA d'origine humaine, de la séquence signal de la protéine F de BRSV et/ou de la glycoprotéine d'enveloppe G de BRSV, et/ou par la délétion du fragment d'ADN codant pour le domaine

transmembranaire de F et/ou de G. La délétion du fragment d'ADN codant pour le domaine transmembranaire d'une de ces protéines s'accompagne de préférence de la partie C terminale contiguë. Le vaccin ADN contre BRSV selon l'invention peut donc coder et exprimer un seul antigène de BRSV optimisé (F ou 5 G) ou les deux (F et G).

Des séquences nucléotidiques codant pour les antigènes de BRSV utilisables dans la présente invention et différentes constructions de vecteurs d'expression sont données dans les exemples annexés et dans FR-A1-2751229, notamment dans les exemples 9 et 10, et dans les figures 5 et 6.

10 De manière préférentielle selon l'invention, le vaccin ADN contre BRSV est formulé avec du DMRIE-DOPE, et est composé d'un plasmide d'expression (e.g. pSB114 exemple 4.1.3) codant pour l'antigène F de BRSV optimisé par l'insertion de la séquence signal du tPA humain à la place de la séquence signal de F, par la délétion du fragment de la séquence nucléotidique de F codant pour 15 le domaine transmembranaire et la partie C terminale contiguë, et d'un deuxième plasmide d'expression (e.g. pSB110 exemple 4.2.2) codant pour l'antigène G de BRSV optimisé par l'insertion de la séquence signal du tPA humain à la place de la séquence signal de G, par la délétion du fragment de la séquence nucléotidique codant pour le domaine transmembranaire de G et la partie C 20 terminale contiguë.

La présente invention a aussi pour objet un vaccin ADN amélioré capable d'induire une réponse immunitaire efficace et protectrice chez les bovins contre le virus BVDV.

25 Le virus BVDV est un pestivirus de la famille des *Flaviviridae*. Il est universellement répandu dans les populations bovines et se manifeste par des malformations de fœtus, des avortements ou des symptômes cliniques respiratoires (maladie des muqueuses) et entéritiques (diarrhée virale bovine).

Les virus BVDV se différencient par la gravité des signes cliniques et deux 30 groupes ont été formés, les BVDV de type 1 (signes cliniques inapparents ou

moyens) et ceux de type 2 (signes cliniques aigus, hémorragie, forte morbidité, forte mortalité) (Dean H. J. et Leyh R., 1999, *Vaccine*, **17**, 1117-1124).

Lorsque le type d'un virus BVDV n'est pas précisé clairement, ce virus s'entend comme étant du type 1 ou du type 2.

5 Le virus BVDV est un virus enveloppé à ARN monocaténaire, composé d'un seul gène codant pour une polyprotéine qui après clivage donne plusieurs protéines bien individualisées, notamment la protéine E0 (gp48) et la protéine E2 (gp53) (Vassilev V. B. et al., 1997, *J. Virol.*, **71**, 471-478).

10 Des séquences nucléotidiques codant pour les polyprotéines E0-E2 sont connues et accessibles auprès de la base de données GenBank sous le numéro d'accès M96687 pour BVDV-1 et AF145967 pour BVDV-2.

15 Le vaccin ADN contre BVDV est de préférence formulé avec un adjuvant selon l'invention, notamment le DMRIE, de préférence le DMRIE-DOPE. Ceci peut être facultativement combiné avec soit l'addition de GM-CSF bovin, soit l'optimisation d'au moins un antigène de BVDV, enfin soit l'addition de GM-CSF bovin et l'optimisation d'au moins un antigène de BVDV.

L'addition de GM-CSF bovin peut se faire comme cela est décrit pour BHV-1.

20 L'optimisation des antigènes issus de BVDV se fait par addition d'une séquence " signal ", notamment celle du tPA d'origine humaine, en amont de la séquence nucléotidique codant pour la protéine E0 de BVDV et/ou de la protéine E2 de BVDV, et/ou par la délétion du fragment d'ADN codant pour le domaine transmembranaire de E2, et/ou par l'insertion d'un intron, notamment de l'intron 25 II du gène de la bêta-globine du lapin en amont de la séquence nucléotidique codant pour E0 et/ou pour E2. Le vaccin ADN contre BVDV selon l'invention peut donc coder et exprimer un seul antigène de BVDV optimisé (E0 ou E2) ou les deux (E0 et E2).

30 Des séquences nucléotidiques codant pour les antigènes de BVDV utilisables dans la présente invention et différentes constructions de vecteurs d'expression sont données dans les exemples annexés et dans FR-A1-2751229, notamment dans l'exemple 13, et dans la figure 9.

De manière préférentielle selon l'invention, le vaccin ADN contre BVDV est formulé avec du DMRIE-DOPE, et est composé d'un plasmide d'expression (e.g. pLF1029 exemple 5.1.2, pLF1031 exemple 6.2.2) codant pour l'antigène E0 de BVDV optimisé par l'insertion de la séquence signal du tPA humain en amont de E0 et par l'insertion de l'intron II du gène de la bêta-globine du lapin en amont de E0, et d'un deuxième plasmide d'expression (e.g. pLF1021 exemple 5.2.2, pLF1023 exemple 6.1.2) codant pour l'antigène E2 de BVDV optimisé par l'insertion de la séquence signal du tPA humain en amont de E2, par la délétion du fragment de la séquence nucléotidique codant pour le domaine transmembranaire de E2 et la partie C terminale contiguë et par l'insertion de l'intron II du gène de la bêta-globine du lapin en amont de E2.

Un mélange de plasmides peut avantageusement être réalisé. Le mélange peut comprendre au moins deux plasmides d'expression, chacun exprimant un immunogène différent (E0 ou E2) et/ou provenant d'un type de BVDV différent (BVDV-1 ou BVDV-2). En particulier, un mélange fait de quatre plasmides exprimant BVDV-1 E0, BVDV-1 E2, BVDV-2 E0 et BVDV-2 E2.

La présente invention a aussi pour objet un vaccin ADN amélioré capable d'induire une réponse immunitaire efficace et protectrice chez les bovins contre le virus parainfluenza de type 3 (bPI-3).

Le virus bPI-3 est un *Paramyxovirus*, membre également de la famille des *Paramyxoviridae* (Tsai et al. Infect. Immun. 1975. 11. 783-803).

Des séquences nucléotidiques codant pour les protéines hémagglutinine-neuraminidase (HN) et de la protéine de fusion (F) de bPI-3 sont connues et accessibles auprès de la base de données GenBank sous le numéro d'accès U31671.

Le vaccin ADN contre bPI-3 est de préférence formulé avec un adjuvant selon l'invention, notamment le DMRIE, de préférence le DMRIE-DOPE. Ceci peut être facultativement combiné avec soit l'addition de GM-CSF bovin, soit l'optimisation d'au moins un antigène de bPI-3, enfin soit l'addition de GM-CSF bovin et l'optimisation d'au moins un antigène de bPI-3.

L'addition de GM-CSF bovin peut se faire comme cela est décrit pour BHV-1.

L'optimisation des antigènes issus de bPI-3 se fait par substitution, par une séquence " signal ", notamment celle du tPA d'origine humaine, de la 5 séquence signal de l'hémagglutinine-neuraminidase (HN) de bPI-3 et/ou de la protéine de fusion (F) de bPI-3, et/ou par la délétion du fragment d'ADN codant pour le domaine transmembranaire de HN et/ou de F, et/ou par l'insertion d'un inton, notamment de l'inton II du gène de la bêta-globine du lapin en amont de la séquence nucléotidique codant pour HN et/ou pour F. La délétion du fragment 10 d'ADN codant pour le domaine transmembranaire d'une de ces protéines s'accompagne de préférence de la partie C terminale contiguë. Le vaccin ADN contre bPI-3 selon l'invention peut donc coder et exprimer un seul antigène de PI-3 optimisé (HN ou F) ou les deux (HN et F).

Des séquences nucléotidiques codant pour les antigènes de bPI-3 15 utilisables dans la présente invention et différentes constructions de vecteurs d'expression sont données dans les exemples annexés et dans FR-A1-2751229, notamment dans les exemples 14 et 15, et dans les figures 10 et 11.

De manière préférentielle selon l'invention, le vaccin ADN contre bPI-3 est formulé avec du DMRIE-DOPE, et est composé d'un plasmide d'expression (e.g. 20 pLF1025 exemple 7.1.2) codant pour l'antigène HN de bPI-3 optimisé par l'insertion de la séquence signal du tPA humain à la place de la séquence signal de HN, par la délétion du fragment de la séquence nucléotidique de HN codant pour le domaine transmembranaire et la partie C terminale contiguë et par l'insertion de l'inton II du gène de la bêta-globine du lapin en amont de HN, et 25 d'un deuxième plasmide d'expression (e.g. pLF1027 exemple 7.2.2) codant pour l'antigène F de bPI-3 optimisé par l'insertion de la séquence signal du tPA humain à la place de la séquence signal de F, par la délétion du fragment de la séquence nucléotidique codant pour le domaine transmembranaire de F et la partie C terminale contiguë et par l'insertion de l'inton II du gène de la bêta- 30 globine du lapin en amont de F.

La présente invention a pour objet un vaccin ADN amélioré capable d'induire une réponse immunitaire efficace et protectrice chez le porc contre le virus herpès porcin (PRV).

Le virus PRV est un membre de la famille des *Alphaherpesvirinae*, ce 5 virus est responsable de la maladie d'Aujeszky (Sawitzky D. Arch. Virol. Suppl. 1997. 13. 201-206).

Des séquences nucléotidiques codant pour les glycoprotéines gB, gC et gD, sont connues et accessibles auprès de la base de données GenBank sous le numéro d'accès M17321, AF158090, AF086702.

10 Le vaccin ADN contre PRV est de préférence formulé avec un adjuvant selon l'invention, notamment le DMRIE, de préférence le DMRIE-DOPE. Ceci peut être facultativement combiné avec soit l'addition de GM-CSF porcin (Inumaru S. et Takamatsu H. Immunol. Cell. Biol. 1995. 73. 474-476), soit l'optimisation d'au moins un antigène de PRV, enfin soit l'addition de GM-CSF 15 porcin et l'optimisation d'au moins un antigène de PRV.

L'addition de GM-CSF porcin peut se faire par l'incorporation du polypeptide GM-CSF porcin dans la composition vaccinale ou par l'insertion d'une séquence nucléotidique codant pour le GM-CSF porcin (e.g. accessible auprès de la base de données GenBank sous le numéro d'accès D21074) dans 20 un vecteur d'expression *in vivo*, de préférence un plasmide. De préférence, la séquence nucléotidique codant pour le GM-CSF porcin est insérée dans un deuxième plasmide d'expression (e.g. pLF1033 exemple 14), différent de celui (ou de ceux) dans lequel est inséré le ou les gènes codant pour le ou les antigènes de PRV.

25 L'optimisation des antigènes issus de PRV se fait par substitution, par une séquence " signal ", notamment celle du signal tPA d'origine humaine (GenBank numéro d'accès NM_000930), de la séquence du peptide signal de la glycoprotéine gB et/ou de la glycoprotéine gC et/ou de la glycoprotéine gD, et/ou par la délétion du fragment d'ADN codant pour le domaine transmembranaire de 30 gB et/ou de gC et/ou de gD. La délétion du fragment d'ADN codant pour le domaine transmembranaire d'une de ces glycoprotéines s'accompagne de

préférence de la partie C terminale contiguë. Le vaccin ADN contre PRV selon l'invention peut donc coder et exprimer un seul antigène de PRV optimisé (gB, gC ou gD) ou deux d'entre eux ou les trois, c'est-à-dire gB optimisé, gC optimisé et gD optimisé.

5 Des séquences nucléotidiques codant pour les antigènes de PRV utilisables dans la présente invention et différentes constructions de vecteurs d'expression sont données dans les exemples annexés et dans FR-A1-2751224, notamment dans les exemples 8 et 9 et dans les figures 3 et 5.

10 De manière préférentielle selon l'invention, le vaccin ADN contre PRV est formulé avec du DMRIE-DOPE, et est composé d'un plasmide d'expression (e.g. pSB102 exemple 8.1.2) codant pour l'antigène gB de PRV optimisé par la délétion du fragment de la séquence nucléotidique codant pour le domaine transmembranaire et de la partie C terminale contiguë, d'un deuxième plasmide d'expression (e.g. pSB104 exemple 8.2.2) codant pour l'antigène gC de PRV 15 optimisé par la délétion du fragment de la séquence nucléotidique codant pour le domaine transmembranaire et de la partie C terminale contiguë, et d'un troisième plasmide d'expression (e.g. pSB106 exemple 8.3.2) codant pour l'antigène gD de PRV optimisé par la délétion du fragment de la séquence nucléotidique codant pour le domaine transmembranaire et de la partie C terminale contiguë.

20

La présente invention a pour objet un vaccin ADN amélioré capable d'induire une réponse immunitaire efficace et protectrice chez le porc contre le virus du syndrome respiratoire et reproducteur porcin (PRRSV).

25 Le virus PRRSV est un Arterivirus, membre de la famille des *Arteriviridae*, (Murtaugh *et al.* Arch. Virol. 1995. 140. 1451-1460).

Des séquences nucléotidiques codant pour les protéines codées par les cadres ouverts de lecture COL3, COL5 et COL6 sont connues et accessibles auprès de la base de données GenBank sous le numéro d'accès U87392.

30 Le vaccin ADN contre PRRSV est de préférence formulé avec un adjuvant selon l'invention, notamment le DMRIE, de préférence le DMRIE-DOPE. Ceci peut être facultativement combiné avec soit l'addition de GM-CSF porcin, soit

l'optimisation d'au moins un antigène de PRRSV, enfin soit l'addition de GM-CSF porcin et l'optimisation d'au moins un antigène de PRRSV.

L'addition de GM-CSF porcin peut se faire comme cela est décrit pour PRV.

5 L'optimisation des antigènes issus de PRRSV se fait par substitution, par une séquence " signal ", notamment celle du signal tPA d'origine humaine (GenBank numéro d'accès NM_000930), de la séquence du peptide signal de la protéine codée par le cadre ouvert de lecture 3 (COL3, gp45 ou grande glycoprotéine d'enveloppe) et/ou de la glycoprotéine COL5 (gp25 ou 10 glycoprotéine d'enveloppe E) et/ou de la glycoprotéine COL6 (gp18 ou protéine de membrane), et/ou par la délétion du fragment d'ADN codant pour le domaine transmembranaire de COL3 et/ou de COL5 et/ou de COL6. La délétion du fragment d'ADN codant pour le domaine transmembranaire d'une de ces glycoprotéines s'accompagne de préférence de la partie C terminale contiguë. 15 Le vaccin ADN contre PRRSV selon l'invention peut donc coder et exprimer un seul antigène de PRRSV optimisé (COL3, COL5 ou COL6) ou deux d'entre eux ou les trois, c'est-à-dire COL3 optimisé, COL5 optimisé et COL6 optimisé.

Des séquences nucléotidiques codant pour les antigènes de PRRSV utilisables dans la présente invention et différentes constructions de vecteurs 20 d'expression sont données dans les exemples annexés et dans FR-A1-2751224, notamment dans les exemples 14 à 17 et dans les figures 14 à 17.

De manière préférentielle selon l'invention, le vaccin ADN contre PRRSV est formulé avec du DMRIE-DOPE, et est composé d'un plasmide d'expression (e.g. pLF1009 exemple 9.1.1, pLF1015 exemple 10.1.1) codant pour l'antigène 25 COL3 de PRRSV, d'un deuxième plasmide d'expression (e.g. pLF1012 exemple 9.2.2, pLF1018 exemple 10.2.2) codant pour l'antigène COL5 de PRRSV optimisé par substitution de la séquence signal de COL5 par la séquence peptide signal tPA humain et par la délétion du fragment de la séquence nucléotidique codant pour le domaine transmembranaire et la partie C terminale contiguë, et 30 d'un troisième plasmide d'expression (e.g. pLF1014 exemple 9.3.2, pLF1016 exemple 10.3.2) codant pour l'antigène COL6 de PRRSV optimisé par

substitution de la séquence signal de COL6 par la séquence peptide signal tPA humain et par la délétion du fragment de la séquence nucléotidique codant pour le domaine transmembranaire et la partie C terminale contiguë.

Un mélange de plasmides peut avantageusement être réalisé. Le mélange 5 peut comprendre au moins deux plasmides d'expression, chacun exprimant un immunogène différent (COL3, COL5 ou COL6) et/ou provenant d'une souche de PRRSV différente (e.g. souche européenne, par exemple Lelystad, souche américaine ATCC VR-2332). En particulier, un mélange fait de six plasmides exprimant PRRSV Lelystad COL3, PRRSV Lelystad COL5, PRRSV Lelystad 10 COL6, PRRSV VR-2332 COL3, PRRSV VR-2332 COL5 et PRRSV VR-2332 COL6.

La présente invention a aussi pour objet un vaccin ADN amélioré capable d'induire une réponse immunitaire efficace et protectrice chez les porcins contre 15 le virus de la grippe porcine (SIV).

Le virus SIV est un virus influenza du groupe A, membre de la famille des *Orthomyxoviridae* (Murphy B. R. et Webster R. G. *Virology*, Second Edition, edited by B. N. Fields, D. M. Knipe et al. Raven Press Ltd., New York 1990).

Des séquences nucléotidiques codant pour les protéines hémagglutinine 20 (HA) et neuraminidase (NA) de la souche SIV H1N1 et H3N2 sont connues et accessibles auprès de la base de données GenBank sous le numéro d'accès K00992, U86145, U07146, AF153238.

Le vaccin ADN contre SIV est de préférence formulé avec un adjuvant selon l'invention, notamment le DMRIE, de préférence le DMRIE-DOPE. Ceci 25 peut être facultativement combiné avec soit l'addition de GM-CSF porcin, soit l'optimisation d'au moins un antigène de SIV, enfin soit l'addition de GM-CSF porcin et l'optimisation d'au moins un antigène de SIV.

L'addition de GM-CSF porcin peut se faire comme cela est décrit pour PRV.

30 L'optimisation des antigènes issus de SIV se fait par substitution, par une séquence " signal ", notamment celle du tPA d'origine humaine, de la séquence

signal de l'hémagglutinine (HA) de SIV et/ou de la protéine de la neuraminidase (NA) de SIV, et/ou par la délétion du fragment d'ADN codant pour le domaine transmembranaire de HA et/ou de NA, et/ou par l'insertion d'un intron, notamment de l'intron II du gène de la bêta-globine du lapin en amont de la 5 séquence nucléotidique codant pour HA et/ou pour NA. La délétion du fragment d'ADN codant pour le domaine transmembranaire d'une de ces protéines s'accompagne de préférence de la partie C terminale contiguë. Le vaccin ADN contre SIV selon l'invention peut donc coder et exprimer un seul antigène de SIV optimisé (HA ou NA) ou les deux (HA et NA).

10 Des séquences nucléotidiques codant pour des antigènes de SIV utilisables dans la présente invention et différentes constructions de vecteurs d'expression sont données dans les exemples annexés et dans FR-A1-2751224, notamment dans les exemples 10 et 11, et dans les figures 7 et 9 pour SIV de souche H1N1, et dans les exemples 12 et 13, et dans les figures 11 et 13 pour 15 SIV de souche H3N2.

De manière préférentielle selon l'invention, le vaccin ADN contre SIV est formulé avec du DMRIE-DOPE, et est composé d'un plasmide d'expression (e.g. pLF1002 exemple 11.1.2, pLF1006 exemple 12.1.2) codant pour l'antigène HA de SIV optimisé par l'insertion de la séquence signal du tPA humain à la place 20 de la séquence signal de HA, par la délétion du fragment de la séquence nucléotidique de HA codant pour le domaine transmembranaire et la partie C terminale contiguë, et par l'insertion de l'intron II du gène de la bêta-globine du lapin en amont de HA, et d'un deuxième plasmide d'expression (e.g. pLF1004 exemple 11.2.2, pLF1008 exemple 12.2.2) codant pour l'antigène NA de SIV 25 optimisé par l'insertion de la séquence signal du tPA humain à la place de la séquence signal de NA, par la délétion du fragment de la séquence nucléotidique codant pour le domaine transmembranaire de NA et la partie C terminale contiguë, et par l'insertion de l'intron II du gène de la bêta-globine du lapin en amont de NA.

30 Un mélange de plasmides peut avantageusement être réalisé. Le mélange peut comprendre au moins deux plasmides d'expression, chacun exprimant un

immunogène différent (HA ou NA) et/ou provenant d'une souche de SIV différente (e.g. H1N1 ou H3N2). En particulier, un mélange fait de quatre plasmides exprimant SIV H1N1 HA, SIV H1N1 NA, SIV H3N2 HA et SIV H3N2 NA.

5 Bien que l'invention soit décrite en liaison avec des vaccins ADN particuliers, l'invention et notamment l'utilisation des adjuvants selon l'invention s'applique également à des vaccins ADN dirigés contre d'autres pathogènes de ces espèces animales.

10 Dans le même ordre d'idée, les vaccins selon l'invention peuvent être, pour une espèce animale, combinés entre eux et/ou avec des vaccins ADN dirigés contre d'autres pathogènes de la même espèce.

Ces autres pathogènes peuvent être notamment les virus de la rage, de la peste porcine et parvovirus porcins.

15 Une préparation immunogène ou un vaccin ADN amélioré selon l'invention contre le virus de la rage comprend notamment un plasmide codant pour la glycoprotéine G non modifiée du virus de la rage et du DMRIE-DOPE et facultativement l'addition de GM-CSF.

20 Une préparation immunogène ou un vaccin ADN amélioré selon l'invention contre le parvovirus porcin comprend notamment un plasmide codant pour un antigène issu du parvovirus porcin (e.g. la protéine VP2, exemple 18 et figure 18 de FR-A1-2751224) et du DMRIE-DOPE et facultativement l'addition de GM-CSF porcin (e.g. pLF1033, exemple 14).

25 Une préparation immunogène ou un vaccin ADN amélioré selon l'invention contre le virus de la peste porcine (HCV) comprend notamment un plasmide codant pour un antigène issu de HCV (e.g. la protéine E1, exemple 19 et figure 19 de ou la protéine E2, exemple 20 et figure 20 de même document) et du DMRIE-DOPE et facultativement du GM-CSF porcin (e.g. pLF1033, exemple 14).

30 Ainsi, la présente invention a également pour objet des vaccins ADN multivalents améliorés permettant d'obtenir une protection efficace chez les

bovins contre au moins deux pathogènes bovins choisis parmi le groupe formé des virus BHV-1, BRSV, BVDV bPI-3 et rage.

La présente invention a également pour objet des vaccins ADN multivalents améliorés permettant d'obtenir une protection efficace chez le porc contre au moins deux pathogènes porcins choisis parmi le groupe formé des virus PRV, PRRSV, SIV, virus de la peste porcine (Hog Cholera Virus ou HCV), et parvovirus porcins.

Les vaccins ADN multivalents peuvent être améliorés par leur formulation avec un adjuvant selon l'invention, notamment avec le DMRIE, de préférence avec le DMRIE-DOPE. Ceci peut être facultativement combiné soit avec l'addition de GM-CSF comme cela est précédemment décrit, soit avec l'optimisation d'au moins un antigène d'intérêt comme cela est précédemment décrit, enfin soit par l'addition de GM-CSF et l'optimisation d'au moins un antigène d'intérêt.

Les vaccins ADN multivalents améliorés selon l'invention se composent d'un ou plusieurs plasmides d'expression, de telle façon que ces vaccins conduisent à l'expression *in vivo* d'au moins un immunogène d'un premier pathogène et d'au moins un immunogène d'au moins un autre pathogène, infectant la même espèce animale. L'un au moins de ces immunogènes est de préférence choisi parmi les membres du groupe suivant :

- F de BRSV, G de BRSV, gB de BHV-1, gC de BHV-1, gD de BHV-1, E0 de BVDV-1, E2 de BVDV-1, E0 de BVDV-2, E2 de BVDV-2, F de bPI-3 et HN de bPI-3 pour les bovins, et

- gB de PRV, gC de PRV, gD de PRV, COL3 de PRRSV souche Lelystad, COL5 de PRRSV souche Lelystad, COL6 de PRRSV souche Lelystad, COL3 de PRRSV souche VR-2332, COL5 de PRRSV souche VR-2332, COL6 de PRRSV souche VR-2332, HA de SIV souche H1N1, NA de SIV souche H1N1, HA de SIV souche H3N2 et NA de SIV souche H3N2 pour les porcins.

Les vaccins ADN monovalents ou multivalents améliorés selon l'invention peuvent également être également associés avec au moins un vaccin classique (inactivé, vivant atténué, sous-unités) ou vaccin recombiné utilisant un vecteur

d'expression *in vivo* (e.g. poxvirus, adénovirus, herpèsvirus) dirigé contre au moins un pathogène différent infectant la même espèce.

L'homme de l'art peut se reporter à FR-A1-2751229 pour les méthodes pour construire les plasmides contenant ces valences bovines, à FR-A1-2751224 5 pour les valences porcines.

La présente invention a également pour objet une méthode de vaccination des animaux de rente, notamment des bovins ou des porcins. Cette méthode de vaccination comprend l'administration d'un des vaccins ADN améliorés monovalents ou multivalents tels que décrits précédemment. Ces méthodes de 10 vaccination concernent la femelle gestante en vue du transfert passif de l'immunité ou le jeune animal ou l'adulte. Cette méthode de vaccination comprend l'administration d'une ou plusieurs doses du vaccin ADN amélioré.

La quantité d'ADN utilisée dans les vaccins selon la présente invention est comprise entre environ 10 µg et environ 1000 µg, et préférentiellement entre 15 environ 50 µg et environ 500 µg, pour un plasmide donné. L'homme de l'art possède les compétences nécessaires pour définir précisément la dose efficace d'ADN à utiliser pour chaque protocole de vaccination.

Les volumes de dose peuvent être de préférence compris entre 0,2 et 5 ml, de préférence entre 1 et 3 ml.

20 Les vaccins ADN améliorés selon l'invention peuvent être administrés, dans le cadre de cette méthode de vaccination, par les différentes voies d'administration proposées dans l'art antérieur pour la vaccination polynucléotidique et au moyen des techniques d'administration connues.

25 Suivant une modalité préférée de l'invention, les méthodes de vaccination comprennent l'administration par la voie intramusculaire, sous-cutanée ou à l'aide d'un injecteur sans aiguille par voie intradermique des vaccins ADN améliorés selon l'invention.

L'invention va être maintenant décrite plus en détail à l'aide de modes de réalisation pris à titre d'exemples non limitatifs et se référant aux dessins dans lesquels :

5 Figure N° 1 : Plasmide pVR1012
 Figure N° 2 : Plasmide pAB110

Listes des séquences :

SEQ ID NO 1 : oligonucléotide PB326
10 SEQ ID NO 2 : oligonucléotide PB329
 SEQ ID NO 3 : oligonucléotide SB090
 SEQ ID NO 4 : oligonucléotide SB091
 SEQ ID NO 5 : oligonucléotide LF001
 SEQ ID NO 6 : oligonucléotide LF002
15 SEQ ID NO 7 : oligonucléotide PB234
 SEQ ID NO 8 : oligonucléotide PB235
 SEQ ID NO 9 : oligonucléotide PB511
 SEQ ID NO 10 : oligonucléotide PB512
 SEQ ID NO 11 : oligonucléotide SB221
20 SEQ ID NO 12 : oligonucléotide SB222
 SEQ ID NO 13 : oligonucléotide PB507
 SEQ ID NO 14 : oligonucléotide PB508
 SEQ ID NO 15 : oligonucléotide PB513
 SEQ ID NO 16 : oligonucléotide PB514
25 SEQ ID NO 17 : oligonucléotide SB223
 SEQ ID NO 18 : oligonucléotide SB224
 SEQ ID NO 19 : oligonucléotide PB497
 SEQ ID NO 20 : oligonucléotide PB498
 SEQ ID NO 21 : oligonucléotide SB225
30 SEQ ID NO 22 : oligonucléotide SB226
 SEQ ID NO 23 : oligonucléotide SB210
 SEQ ID NO 24 : oligonucléotide SB211

SEQ ID NO 25 : oligonucléotide SB212
SEQ ID NO 26 : oligonucléotide SB220
SEQ ID NO 27 : oligonucléotide SB213
SEQ ID NO 28 : oligonucléotide SB214
5 SEQ ID NO 29 : oligonucléotide SB215
SEQ ID NO 30 : oligonucléotide SB216
SEQ ID NO 31 : oligonucléotide LF050
SEQ ID NO 32 : oligonucléotide LF051
SEQ ID NO 33 : oligonucléotide LF052
10 SEQ ID NO 34 : oligonucléotide LF053
SEQ ID NO 35 : oligonucléotide LF039
SEQ ID NO 36 : oligonucléotide LF040
SEQ ID NO 37 : oligonucléotide LF041
SEQ ID NO 38 : oligonucléotide LF042
15 SEQ ID NO 39 : oligonucléotide LF043
SEQ ID NO 40 : oligonucléotide LF044
SEQ ID NO 41 : oligonucléotide LF045
SEQ ID NO 42 : oligonucléotide LF046
SEQ ID NO 43 : oligonucléotide LF064
20 SEQ ID NO 44 : oligonucléotide LF065
SEQ ID NO 45 : oligonucléotide LF066
SEQ ID NO 46 : oligonucléotide LF067
SEQ ID NO 47 : oligonucléotide LF047
SEQ ID NO 48 : oligonucléotide LF048
25 SEQ ID NO 49 : oligonucléotide LF058
SEQ ID NO 50 : oligonucléotide LF059
SEQ ID NO 51 : oligonucléotide LF060
SEQ ID NO 52 : oligonucléotide LF061
SEQ ID NO 53 : oligonucléotide LF062
30 SEQ ID NO 54 : oligonucléotide LF063
SEQ ID NO 55 : oligonucléotide SB201

SEQ ID NO 56 : oligonucléotide SB202
SEQ ID NO 57 : oligonucléotide SB203
SEQ ID NO 58 : oligonucléotide SB217
SEQ ID NO 59 : oligonucléotide SB204
5 SEQ ID NO 60 : oligonucléotide SB205
SEQ ID NO 61 : oligonucléotide SB206
SEQ ID NO 62 : oligonucléotide SB218
SEQ ID NO 63 : oligonucléotide SB207
SEQ ID NO 64 : oligonucléotide SB208
10 SEQ ID NO 65 : oligonucléotide SB209
SEQ ID NO 66 : oligonucléotide SB219
SEQ ID NO 67 : oligonucléotide LF027
SEQ ID NO 68 : oligonucléotide LF028
SEQ ID NO 69 : oligonucléotide LF019
15 SEQ ID NO 70 : oligonucléotide LF020
SEQ ID NO 71 : oligonucléotide LF021
SEQ ID NO 72 : oligonucléotide LF022
SEQ ID NO 73 : oligonucléotide LF023
SEQ ID NO 74 : oligonucléotide LF024
20 SEQ ID NO 75 : oligonucléotide LF025
SEQ ID NO 76 : oligonucléotide LF026
SEQ ID NO 77 : oligonucléotide LF037
SEQ ID NO 78 : oligonucléotide LF038
SEQ ID NO 79 : oligonucléotide LF029
25 SEQ ID NO 80 : oligonucléotide LF030
SEQ ID NO 81 : oligonucléotide LF031
SEQ ID NO 82 : oligonucléotide LF032
SEQ ID NO 83 : oligonucléotide LF033
SEQ ID NO 84 : oligonucléotide LF034
30 SEQ ID NO 85 : oligonucléotide LF035
SEQ ID NO 86 : oligonucléotide LF036

SEQ ID NO 87 : oligonucléotide LF003
SEQ ID NO 88 : oligonucléotide LF004
SEQ ID NO 89 : oligonucléotide LF005
SEQ ID NO 90 : oligonucléotide LF006
5 SEQ ID NO 91 : oligonucléotide LF007
SEQ ID NO 92 : oligonucléotide LF008
SEQ ID NO 93 : oligonucléotide LF009
SEQ ID NO 94 : oligonucléotide LF010
SEQ ID NO 95 : oligonucléotide LF011
10 SEQ ID NO 96 : oligonucléotide LF012
SEQ ID NO 97 : oligonucléotide LF013
SEQ ID NO 98 : oligonucléotide LF014
SEQ ID NO 99 : oligonucléotide LF015
SEQ ID NO 100 : oligonucléotide LF016
15 SEQ ID NO 101 : oligonucléotide LF017
SEQ ID NO 102 : oligonucléotide LF018
SEQ ID NO 103 : oligonucléotide LF054
SEQ ID NO 104 : oligonucléotide LF055
SEQ ID NO 105 : oligonucléotide LF056
20 SEQ ID NO 106 : oligonucléotide LF057

EXEMPLES :

Pour chacun des pathogènes considérés, chaque gène codant pour les principaux antigènes (forme native et forme modifiée) fait l'objet d'une construction particulière dans un plasmide d'expression eucaryote. Les formes secrétées des antigènes sont obtenues par délétion des fragments de gènes codant pour les domaines trans-membranaires et cytoplasmiques. Dans tous les cas, les domaines trans-membranaires des protéines sont identifiés sur la base des profils d'hydropathie (sur MacVector 6.5) des séquences protéiques correspondantes.

Exemple 1 : Méthodes de biologie moléculaire

5 1.1 Extraction d'ADN génomique viral

Des suspensions virales sont traitées par la protéinase K (100 mg/ml final) en présence de sodium dodécyl sulfate (SDS) (0.5% final) pendant 2 heures à 37 °C. L'ADN viral est ensuite extrait à l'aide d'un mélange phénol/chlorophorme, puis précipité avec deux volumes d'éthanol absolu à -20°C pendant 16 heures et ensuite centrifugé à 10 000 g pendant 15 minutes à 4°C. Les culots d'ADN sont séchés, puis repris dans un volume minimum d'eau ultrapure stérile.

1.2 Isolement d'ARN génomique viral

L'ARN génomique de chaque virus est extrait en utilisant la technique du " thiocyanate de guanidinium/phénol-chlorophorme " décrite par P. Chomczynski et N. Sacchi (Anal. Biochem. 1987. **162**. 156-159).

1.3 Techniques de biologie moléculaire

Toutes les constructions de plasmides sont réalisées en utilisant les techniques standard de biologie moléculaire décrites par Sambrook et al. (Molecular Cloning : A Laboratory Manual. 2nd Edition . Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, 1989). Tous les fragments de restriction utilisés pour la présente invention sont isolés à l'aide du kit " Geneclean " (BIO101 Inc., La Jolla, CA). Pour toutes les constructions, les fragments d'ADN clonés, ainsi que les jonctions avec le vecteur d'expression, sont séquencés par la méthode de Sanger (Sambrook *et al.* 1989).

1.4 PCR et RT-PCR

Les oligonucléotides spécifiques des gènes ou des fragments de gènes clonés sont synthétisés, certains d'entre eux comportant dans certains cas à leur extrémité 5' des sites de restriction facilitant le clonage des fragments amplifiés.

Les réactions de transcription inverse (RT) et l'amplification en chaîne par polymérase (PCR) sont effectuées selon des techniques standard (Sambrook *et al.* 1989).

5 **1.5 Purification de plasmides à grande échelle**

La production, à l'échelle de la dizaine de mg, de plasmides purifiés entrant dans les compositions vaccinales est effectuée par la méthode des gradients de chlorure de césium-bromure d'éthidium (Sambrook *et al.* 1989).

10

Exemple 2 : Constructions plasmidiques de base

Le plasmide d'expression eucaryote pVR1020 (C. J. Luke *et al.* J. of Infectious Diseases. 1997. 175. 95-97), dérivé du plasmide pVR1012 (Figure N° 1, figure 1 et exemple 7 de WO-A-9803199), contient la phase codante de la 15 séquence-signal de l'activateur du plasminogène tissulaire humain (tPA).

Un plasmide pVR1020 est modifié par digestion BamHI-BgIII et insertion d'une séquence contenant plusieurs sites de clonage (BamHI, NotI, EcoRI, XbaI, PmlI, PstI, BgIII) et résultant de l'appariement des oligonucléotides suivants :

PB326 (40 mer) (SEQ ID NO 1)

20 5' GATCTGCAGCACGTGTCTAGAGGATATCGAATTCGCGGCC 3' et

PB329 (40 mer) (SEQ ID NO 2)

5' GATCCGCGGCCGCGAATTCGATATCCTCTAGACACGTGCT 3'.

Le vecteur ainsi obtenu, d'une taille d'environ 5105 paires de bases (ou pb), est nommé pAB110 (Figure N° 2).

25 L'intron II du gène de la β -globine de lapin est cloné dans le vecteur pCRII (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) après obtention du fragment d'ADN correspondant par PCR à l'aide des oligonucléotides suivants :

SB090 (20 mer) (SEQ ID NO 3)

5' TTGGGGACCCTTGATTGTTC 3' et

30 SB091 (21 mer) (SEQ ID NO 4)

5' CTGTAGGAAAAAGAAGAAGGC 3'

en utilisant comme matrice l'ADN génomique de cellules du sang périphérique de lapin. Le plasmide résultant est désigné pNS050.

Le plasmide d'expression pAB110 est modifié par l'introduction de la séquence de l'intron II du gène de la globine du lapin dans le site Sall situé en 5 amont de l'ATG du peptide signal de l'activateur du plasminogène tissulaire (tPA). La séquence de l'intron II du gène de la globine du lapin est amplifiée par amplification en chaîne par polymérase (ACP ou PCR) à partir du plasmide pNS050 en utilisant le couple d'oligonucléotides suivants :

LF001 (30 mer) (SEQ ID NO 5)

10 5' CTCCATGTCGACTTGGGGACCCTTGATTGT 3' et

LF002 (30 mer) (SEQ ID NO 6)

5' CTCCATGTCGACCTGTAGGAAAAAGAAGAA 3'

Le produit de PCR (573 paires de bases ou pb) est digéré par Sall et cloné dans le plasmide pAB110 préalablement linéarisé par Sall, pour générer le 15 plasmide pLF999 d'environ 5678 pb.

Exemple 3 : Plasmides codant pour les différentes formes des antigènes du virus herpès bovin de type 1 (BHV-1)

20 Des fragments d'ADN viral contenant les gènes gB, gC et gD de la souche B901 de BHV-1 sont isolés en digérant le génome viral par différents enzymes

de restriction, en les séparant par électrophorèse en gel d'agarose et en les analysant par Southern blot à l'aide de sondes correspondant à des fragments des gènes gB, gC et gD de la souche ST de BHV-1 (Leung-Tack P. et al.

25 Virology. 1994. 199. 409-421). La souche BHV-1 Colorado [Cooper] (ATCC

numéro VR-864) peut également être utilisée. Les fragments ainsi identifiés sont clonés dans le vecteur pBluescript SK+ (Stratagene, La Jolla, CA, USA) et sont à l'origine des clonages des trois gènes dans le vecteur d'expression pVR1012.

3.1 Plasmides codant pour les différentes formes de BHV-1 gB

3.1.1 pPB280 : gène gB (forme native) cloné dans le vecteur pVR1012

Deux fragments Xhol-Xhol contenant les parties 5' et 3' du gène gB de BHV-1 sont identifiés par Southern blot et clonés dans le vecteur pBluescript SK+ (Stratagene, La Jolla, CA, USA) préalablement digéré par Xhol. Les plasmides ainsi obtenus sont respectivement désignés pPB128 et pPB117.

Le plasmide pPB128, contenant le fragment 5' du gène gB, est digéré par NotI et Xhol, générant un fragment de 1708 pb (fragment A).

Le plasmide pPB117, contenant la partie 3' du gène gB, est digéré par Xhol et Stul, générant un fragment de 1345 pb. Ce dernier fragment est cloné dans le vecteur pBluescript KS+ (Stratagene, La Jolla, CA, USA) préalablement digéré par EcoRV et Xhol. Le plasmide résultant est nommé pPB279. Le plasmide pPB279 est ensuite digéré par Xhol et BamHI, générant un fragment d'ADN de 1413 pb (fragment B).

Les fragments A et B sont ensuite clonés dans un vecteur pBluescript KS+ digéré par NotI et BamHI, générant le plasmide pPB278 (environ 6063 pb) et permettant la reconstitution du gène gB de BHV-1.

Le vecteur pPB278 sert ensuite de matrice lors d'une réaction de PCR réalisée avec les oligonucléotides suivants :

PB234 (30 mer) (SEQ ID NO 7)

5' TTGTCGACATGGCCGCTCGCGGCGGTGCTG 3' et

PB235 (21 mer) (SEQ ID NO 8)

5' GCAGGGCAGCGGCTAGCGCGG 3'.

Le produit de PCR (146 pb) est ensuite digéré par les enzymes de restriction Sall et Nhel.

Le plasmide pPB278 est digéré par Nhel et BamHI. Le fragment de 2728 pb ainsi obtenu et le fragment PCR précédemment digéré sont ligaturés dans le vecteur pVR1012 (exemple 2) préalablement digéré par Sall et BamHI, générant ainsi le plasmide pPB280, d'une taille d'environ 7742 pb.

Le gène gB de BHV-1 code pour une protéine de 933 acides aminés.

3.1.2 pPB281: gène gB (forme Δ [TM-Cter]) cloné dans le vecteur pVR1012

La forme tronquée (délétée de ses domaines transmembranaire (TM) et carboxy-terminal (Cter)) du gène gB de BHV-1 est obtenue en ligaturant dans le 5 plasmide pVR1012 (exemple 2) prédigéré par Sall et BamHI, à la fois un fragment d'une taille de 2234 pb obtenu après digestion par Sall-PvuII du plasmide pPB280 (exemple 3.1.1) et un fragment de 56 pb obtenu par l'appariement des oligonucléotides suivants :

PB511 (52 mer) (SEQ ID NO 9)
 10 5'CTGCACGAGCTCCGGTTCTACGACATTGACCGCGTGGTCAAGACGGACT
 GAG 3' et
 PB512 (57 mer) (SEQ ID NO 10)
 5'GATCCTCAGTCCGTCTTGACCACGCGGTCAATGTCGTAGAACCGGAGCTC
 GTGCAG 3'.

15 Le plasmide ainsi généré a une taille d'environ 7154 pb et est nommé pPB281. Le gène gB tronqué de BHV-1 code pour une protéine de 759 acides aminés.

3.1.3 pSB115 : gène gB (forme tPA Δ [TM-Cter]) cloné dans le vecteur 20 pAB110

La forme tPA Δ [TM-Cter] du gène gB de BHV-1 est amplifiée par PCR à partir de la matrice pPB281 (exemple 3.1.2) et à l'aide des amorces suivantes :
 SB221 (39 mer) (SEQ ID NO 11)
 5' AAAATTCGATATCCGCCGCGGGCGACCGGCGACAAACG 3' et
 25 SB222 (33 mer) (SEQ ID NO 12)
 5' GGAAGATCTTCAGTCCGTCTTGACCACGCGGT 3'.

Le produit d'amplification (2088 pb) est digéré par les enzymes EcoRV et BgIII et cloné dans le vecteur pAB110 (exemple 2) préalablement digéré par EcoRV et BgIII, générant le plasmide pSB115, d'une taille d'environ 7154 pb.

La forme tPA Δ [TM-Cter] du gène gB code pour une glycoprotéine de 729 acides aminés, contenant le domaine extracellulaire de la glycoprotéine gB de BHV-1.

5 **3.2. Plasmides codant pour les différentes formes de BHV-1 gC**

3.2.1 pPB264 : gène gC (forme native) cloné dans le vecteur pVR1012

Un fragment BamHI-HindIII de 3,5 kb contenant le gène complet gC de BHV-1 est identifié par Southern blot et cloné dans le vecteur pBluescript SK+.

10 Le plasmide ainsi obtenu est nommé pPB287.

Le plasmide pPB287 est ensuite digéré par Ncol-BssSI. Un fragment de digestion d'une taille de 1492 pb est obtenu. Il est ligaturé avec un fragment d'ADN de synthèse obtenu par l'appariement des oligonucléotides suivants :

PB507 (37 mer) (SEQ ID NO 13)

15 5' TCGTGCCTGCGCGCAAGGCCGGCGCGCCTGTAGT 3' et

PB508 (37 mer) (SEQ ID NO 14)

5' CTAGACTACAGGCGCGCCGGCCTTGCGCCGCAGGC 3',

dans le plasmide pLitmus 28 (New England Biolabs, Inc., Beverly, MA, USA) prédigéré par Ncol et XbaI, générant le plasmide intermédiaire pPB290.

20 Le fragment de 1554 pb issu de la digestion de pPB290 par PstI et XbaI est cloné dans le vecteur pVR1012 (exemple 2) préalablement digéré par PstI et XbaI, générant ainsi le plasmide pPB264, d'une taille d'environ 6427 pb. Le gène gC de BHV-1 code pour une protéine de 508 acides aminés.

25 **3.2.2 pPB292 : gène gC (forme Δ [TM-Cter]) cloné dans le vecteur pVR1012**

La forme tronquée du gène gC de BHV-1 est obtenue en ligaturant les trois fragments d'ADN suivants dans le vecteur pVR1012 (exemple 2) préalablement digéré par PstI et XbaI :

(a) un fragment de 1035 pb issu de la digestion de pPB264 (exemple

30 3.2.1) par PstI et XbaI,

(b) un fragment de 350 pb issu de la digestion par Xhol et BanI de pPB264 et

(c) un fragment de synthèse de 43 pb résultant de l'appariement des oligonucléotides PB513 et PB514.

5 Ces oligonucléotides sont les suivants :

PB513 (43 mer) (SEQ ID NO 15)

5' GCACCGCTGCCGAGTTCTCCGCGACCGCCACGTACGACTAGT 3' et

PB514 (43 mer) (SEQ ID NO 16)

5' CTAGACTAGTCGTACGTGGCGGTCGCGGAGAACTCGGGCAGCG 3'.

10 Le plasmide d'une taille d'environ 6305 pb, ainsi obtenu, est nommé pPB292. Le gène gC tronqué de BHV-1 code pour une protéine de 466 acides aminés.

3.2.3 pSB116 : gène gC (forme tPA Δ [TM-Cter]) cloné dans le vecteur pAB110

15 La forme tPA Δ [TM-Cter] du gène gC de BHV-1 est amplifiée par PCR à partir de la matrice pPB292 (exemple 3.2.2) et à l'aide des amorces suivantes :

SB223 (39 mer) (SEQ ID NO 17)

5' AAAATTCGATATCCGGCGGGGGCTCGCCGAGGAGGGCG 3' et

20 SB224 (32 mer) (SEQ ID NO 18)

5' GGAAGATCTCTAGTCGTACGTGGCGGTCGCGG 3'.

Le produit d'amplification (1362 pb) est digéré par les enzymes EcoRV et BgIII et cloné dans le vecteur pAB110 (exemple 2) préalablement digéré par EcoRV et BgIII, générant le plasmide pSB116, d'une taille d'environ 6404 pb.

25 La forme tPA Δ [TM-Cter] du gène gC code pour une glycoprotéine de 479 acides aminés, contenant le domaine extracellulaire de la glycoprotéine gC de BHV-1.

3.3 Plasmides codant pour les différentes formes de BHV-1 gD

30

3.3.1 pPB148 : gène gD (forme native) cloné dans le vecteur pVR1012

Un fragment Xhol-Xhol de 5 kb contenant le gène gD de BHV-1 est identifié par Southern blot et cloné dans le vecteur pBluescript SK+ prédigéré par Xhol, générant le plasmide pPB147.

5 Un fragment de 325 pb issu de la digestion de pPB147 par Ndel et BsrBI et un fragment de 943 pb issu de la digestion de pPB147 par Ndel et StyI sont ensuite ligaturés dans le vecteur pVR1012 (exemple 2) prédigéré par EcoRV et XbaI, générant ainsi le plasmide pPB148, d'une taille d'environ 6171 pb. Le gène gD de BHV-1 code pour une protéine de 417 acides aminés.

10 **3.3.2 pPB284 : gène gD (forme Δ [TM-Cter]) cloné dans le vecteur pVR1012**

Le gène gD tronqué de BHV-1 est obtenu à partir d'un fragment obtenu après amplification par PCR réalisée sur l'ADN génomique de la souche B901 du virus BHV-1 préalablement digéré par PstI et XbaI et à l'aide du couple d'amorces suivantes :

15 PB497 (33 mer) (SEQ ID NO 19)

5' TTTCTGCAGATGCAAGGGCCGACATTGGCCGTG 3' et

PB498 (31 mer) (SEQ ID NO 20)

5' TTTCTAGATTAGGGCGTAGCGGGGGCGGGCG 3'.

20 Ce fragment de PCR est ensuite cloné dans le plasmide pVR1012 (exemple 2) préalablement digéré par PstI et XbaI, générant le plasmide pPB284, d'une taille d'environ 5943 pb. Le gène gD tronqué de BHV-1 code pour une protéine de 355 acides aminés.

25 **3.3.3 pSB117 : gène gD (forme tPA Δ [TM-Cter]) cloné dans le vecteur pAB110**

La forme tPA Δ [TM-Cter] du gène gD de BHV-1 est amplifiée par PCR à partir de la matrice pPB284 (exemple 3.3.2) et à l'aide des amorces suivantes :

SB225 (39 mer) (SEQ ID NO 21)

5' AAAATTCGATATCCCCCGCGCCGCGGGTGACGGTATAC 3' et

30 SB226 (33 mer) (SEQ ID NO 22)

5' GGAAGATCTTAGGGCGTAGCGGGGGCGGGCGG 3'.

Le produit d'amplification (1029 pb) est digéré par les enzymes EcoRV et BgIII et cloné dans le vecteur pAB110 (exemple 2) préalablement digéré par EcoRV et BgIII, générant le plasmide pSB117, d'une taille d'environ 6071 pb.

La forme tPA Δ [TM-Cter] du gène gD code pour une glycoprotéine de 368 acides aminés, contenant le domaine extracellulaire de la glycoprotéine gD de BHV-1.

Exemple 4 : Plasmides codant pour les différentes formes des antigènes du virus respiratoire syncitial bovin (BRSV)

10 Les gènes codant pour les antigènes F et G du virus BRSV sont obtenus par RT-PCR à partir de l'ARN viral de la souche Snook (Thomas *et al.* Research in Vet. Science. 1982. 33. 170-182). La souche BRSV A 51908 (ATCC numéro VR-794) peut également être utilisée.

15 **4.1 Plasmides codant pour les différentes formes de BRSV-F**

4.1.1 pSB107 : gène F (forme native) cloné dans le vecteur pVR1012

Le gène F de la souche Snook de BRSV est amplifié par RT-PCR en utilisant l'ARN viral comme matrice et à l'aide des amorces suivantes :

20 SB210 (34 mer) (SEQ ID NO 23)
 5' AAATTTCTGCAGATGGCGACAACAGCCATGAGG 3' et
 SB211 (35 mer) (SEQ ID NO 24)
 5' TTAAGGATCCTCATTACTAAAGGAAAGATTGTTG 3'.

25 Le produit d'amplification, d'une taille de 1739 pb, est digéré par les enzymes PstI et BamHI et cloné dans le vecteur pVR1012 (exemple 2) préalablement digéré par PstI et BamHI, générant ainsi le plasmide pSB107, d'une taille d'environ 6583 pb.

Le gène F du virus BRSV code pour une protéine de 574 acides aminés.

30 **4.1.2 pSB108 : gène F (forme Δ [TM-Cter]) cloné dans le vecteur pVR1012**

La forme tronquée du gène F de la souche Snook de BRSV est amplifiée par RT-PCR en utilisant l'ARN viral comme matrice et à l'aide des amorces suivantes :

SB210 (SEQ ID NO 23) et

5 SB212 (39 mer) (SEQ ID NO 25)

5' AATTTGGATCCTCATGTGGTGGATTTCTACATCTAC 3'.

Le produit d'amplification (1581 pb) est digéré par les enzymes PstI et BamHI et cloné dans le vecteur pVR1012 (exemple 2) préalablement digéré par PstI et BamHI, générant le plasmide pSB108, d'une taille d'environ 6430 pb.

10 La forme tronquée du gène F code pour une glycoprotéine de 523 acides aminés, contenant le domaine extracellulaire de la glycoprotéine F de BRSV.

4.1.3 pSB114 : gène F (forme tPA Δ[TM-Cter]) cloné dans le vecteur pAB110

La forme tPA Δ[TM-Cter] du gène F de la souche Snook de BRSV est 15 amplifiée par RT-PCR en utilisant l'ARN viral comme matrice et à l'aide des amorces suivantes :

SB212 (SEQ ID NO 25) et

SB220 (38 mer) (SEQ ID NO 26)

5' AAAATTACGTGAACATAACAGAAGAATTTATCAATC 3'.

20 Le produit d'amplification (1516 pb) est digéré par les enzymes PmlI et BglII et cloné dans le vecteur pAB110 (exemple 2) préalablement digéré par PmlI et BglII, générant le plasmide pSB114, d'une taille d'environ 6572 pb.

La forme tPA Δ[TM-Cter] du gène F code pour une glycoprotéine de 535 25 acides aminés, contenant le domaine extracellulaire de la glycoprotéine F de BRSV.

4.2 Plasmides codant pour les différentes formes de BRSV-G

Dans le cas de la protéine G du BRSV (glycoprotéine de type II), la 30 séquence-signal et la séquence trans-membranaire sont confondues, nécessitant l'addition d'une séquence signal en amont de la séquence

correspondant au domaine extracellulaire lors de la délétion du domaine transmembranaire.

Le plasmide pAB110 (exemple 2) est utilisé pour la construction des plasmides contenant la formes tronquée du gène codant pour la protéine G de BRSV.

4.2.1 pSB109 : gène G (forme native) cloné dans le vecteur pVR1012

Le gène G de la souche Snook de BRSV est amplifié par RT-PCR en utilisant l'ARN viral comme matrice et à l'aide des amorces suivantes :

10 SB213 (32 mer) (SEQ ID NO 27)
 5' ACGCGTCGACATGTCCAACCATACCCATCATC 3' et
 SB214 (38 mer) (SEQ ID NO 28)
 5' TTAAAATCTAGATTAGATCTGTAGTTGATTGATTG 3'.

Le produit d'amplification (784 pb) est digéré par les enzymes Sall et XbaI et cloné dans le vecteur pVR1012 (exemple 2) préalablement digéré par Sall et XbaI, générant le plasmide pSB109, d'une taille d'environ 5661 pb.

Le gène G de BRSV code pour un glycoprotéine de 257 acides aminés.

4.2.2 pSB110 : gène G (forme tPA Δ[TM-Cter]) cloné dans le vecteur pAB110

20 La forme tronquée du gène G de la souche Snook de BRSV est amplifiée par RT-PCR en utilisant l'ARN viral comme matrice et à l'aide des amorces suivantes :

SB215 (33 mer) (SEQ ID NO 29)
 5' TTTTAAGGATCCGCTAAAGCCAAGGCCACATCC 3' et
 25 SB216 (33 mer) (SEQ ID NO 30)
 5' TTAAAATCTAGATTAGATCTGTAGTTGATTG 3'.

Le produit d'amplification (666 pb) est digéré par les enzymes BamHI et XbaI et cloné dans le vecteur pAB110(exemple 2) préalablement digéré par BamHI et XbaI, générant le plasmide pSB110, d'une taille d'environ 5660 pb.

30 La forme tPA Δ[TM-Cter] du gène G du virus BRSV code pour une glycoprotéine de 218 acides aminés, contenant le domaine extracellulaire de la

glycoprotéine G, mais précédée par la séquence signal de l'activateur du plasminogène tissulaire.

Exemple 5 : Plasmides codant pour les différentes formes des antigènes du virus de la maladie des muqueuses de type 1 des bovins (BVDV-1)

Les gènes codant pour les antigènes E0 (glycoprotéine de 48 kDa ou gp48) et E2 (gp53) des virus BVDV de type 1 sont obtenus par RT-PCR à partir de l'ARN viral de la souche Osloss (L. De Moerlooze *et al.* J. Gen. Virol. 1993. 74. 1433-1438 ; A. Renard *et al.*, DNA, 1985, 4, 439-438 ; A. Renard *et al.*, Ann. Rech. Vet., 1987, 18, 121-125). Les souches NADL (ATCC VR-534) ou New York (ATCC VR-524) peuvent également être utilisées.

5.1 Plasmides codant pour les différentes formes de E0 de la souche BVDV de type 1 Osloss

5.1.1 pLF1028 : gène E0 (forme native) cloné dans le vecteur pVR1012.

L'ADN complémentaire (ADNc) du gène E0 de la souche Osloss est synthétisé à partir de l'ARN viral correspondant à l'aide de l'amorce LF051 et amplifié par une réaction de PCR à l'aide du couple d'oligonucléotides suivants :

LF050 (36 mer) (SEQ ID NO 31)

5' CATAACCGTCGACATGAAGAAACTAGAGAAAGGCCCTG 3' et

LF051 (40 mer) (SEQ ID NO 32)

5' CATAACCGGATCCTCAGGCTGCATATGCCCAAACCATGTC 3'.

Le fragment d'ADN d'environ 765 pb obtenu par digestion du produit de PCR par Sall et BamHI est ligaturé avec un fragment de 4866 pb résultant de la digestion de pVR1012 (exemple 2) par Sall et BamHI pour générer le plasmide pLF1028 (environ 5636 pb). Le gène E0 de BVDV-1 souche Osloss code pour une protéine de 252 acides aminés.

Un codon ATG est introduit dans la séquence de l'oligonucléotide LF050 de façon à permettre l'initiation de la traduction du polypeptide E0 recombinant correspondant.

5.1.2 pLF1029 : gène E0 , forme (β -globine tPA-E0) cloné dans le vecteur pLF999.

Le gène E0 est synthétisé par une réaction de PCR à partir de la matrice pLF1028 (exemple 5.1.1.) et à l'aide du couple d'oligonucléotides suivants :

5 LF052 (39 mer) (SEQ ID NO 33)

5' CATGACCGCGGCCGCTATGAAGAAACTAGAGAAAGCCCTG 3' et

LF053 (40 mer) (SEQ ID NO 34)

5' CATGACAGATCTTAGGCTGCATATGCCCAAACCATGTC 3'.

Le fragment d'ADN d'environ 770 pb obtenu par digestion du produit de 10 PCR par NotI et BgIII est ligaturé avec un fragment de 5642 pb résultant de la digestion de pLF999 (exemple 2) par NotI et BgIII pour générer le plasmide pLF1029 (environ 6417 pb).

Le gène E0 de BVDV-1 souche Osloss ainsi modifié (β -globine tPA-E0) code pour une protéine de 283 acides aminés.

15

5.2 Plasmides codant pour les différentes formes de E2 de la souche BVDV de type 1 Osloss

5.2.1 pLF1020 : gène E2 (forme native) cloné dans le vecteur pVR1012.

20 L'ADNc du gène E2 de la souche Osloss est synthétisé à partir de l'ARN viral correspondant à l'aide de l'amorce LF040 et amplifié par une réaction de PCR à l'aide du couple d'oligonucléotides suivants :

LF039 (33 mer) (SEQ ID NO 35)

5' CATGACGTCGACATGACGACTACTGCATTCCCTG 3' et

25 LF040 (36 mer) (SEQ ID NO 36)

5' CATGACAGATCTCAACGTCCCGAGGTCATTGTTC 3'.

30 Le fragment d'ADN de 1235 pb obtenu par digestion du produit de PCR par Sall et BgIII est ligaturé avec un fragment de 4860 pb résultant de la digestion de pVR1012 (exemple 2) par Sall et BgIII pour générer le plasmide pLF1020 (environ 6100 pb).

Le gène E2 de BVDV-1 souche Osloss code pour une protéine de 409 acides aminés.

Un codon ATG est introduit dans la séquence de l'oligonucléotide LF039 de façon à permettre l'initiation de la traduction du polypeptide E2 recombinant 5 correspondant.

5.2.2 pLF1021 : gène E2, forme (β -globine tPA-E2 Δ [TM+Cter]) cloné dans le vecteur pLF999.

Le gène E2 déléte de ses domaines transmembranaire et carboxy-terminal 10 est synthétisé par une réaction de PCR à partir de la matrice pLF1020 (exemple 5.2.1) et à l'aide du couple d'oligonucléotides suivants :

LF041 (36 mer) (SEQ ID NO 37)

5' CATGACGCGGCCGCTATGACGACTACTGCATTCCCTG 3' et

LF042 (35 mer) (SEQ ID NO 38)

15 5' CATGACAGATCTCAAGCGAAGTAATCCCGGTGGTG 3'.

Le fragment d'ADN de 1132 pb obtenu par digestion du produit de PCR par NotI et BglII est ligaturé avec un fragment de 5642 pb résultant de la digestion de pLF999 (exemple 2) par NotI et BglII pour générer le plasmide pLF1021 (environ 6779 pb).

20 Le gène E2 de BVDB-1 souche Osloss ainsi modifié (β -globine tPA-E2 Δ [TM+Cter]) code pour une protéine de 404 acides aminés.

Exemple 6 : Plasmides codant pour les différentes formes des antigènes du virus de la maladie des muqueuses de type 2 des bovins (BVDV-2)

25 Les gènes codant pour l'antigène E2 (gp53) des virus BVDV de type 2 sont obtenus par RT-PCR à partir de l'ARN viral de la souche 890 (J. F. Ridpath et S. R. Bolin, *Virology*, 1995, **212**, 39-46). La souche Q140 est également utilisable et peut être obtenue auprès du Ministère de l'Agriculture, des pêcheries et de l'alimentation du Québec (MAPAQ), Institut Armand-Frappier (P. Tijssen et 30 al., *Virology*, 1996, **217**, 356-361). Les souches 1373 et 296 sont également

utilisables (J. F. Ridpath, BVDV Research Project, National Animal Disease Center, 2300 Dayton Avenue, Ames, USA).

5 **6.1 Plasmides codant pour les différentes formes de E2 de la souche de type 2 - 890**

6.1.1 pLF1022 : gène E2 (forme native) cloné dans le vecteur pVR1012.

L'ADNc du gène E2 de la souche 890 est synthétisé à partir de l'ARN viral correspondant à l'aide de l'amorce LF044 et amplifié par une réaction de PCR à 10 l'aide du couple d'oligonucléotides suivants :

LF043 (36 mer) (SEQ ID NO 39)

5' ACTGTATCTAGAATGACCACCAAGCTTCCTAATC 3' et

LF044 (39 mer) (SEQ ID NO 40)

5' ACTGTAAGATCTTAAGTATTCACTCCAGCACCCATAGC 3'.

15 Le fragment d'ADN d'environ 1240 pb obtenu par digestion du produit de PCR par XbaI et BglII est ligaturé avec un fragment de 4891 pb résultant de la digestion de pVR1012 (exemple 2) par XbaI et BglII pour générer le plasmide pLF1022 (environ 6136 pb).

20 Le gène E2 de BVDB-2 souche 890 code pour une protéine de 410 acides aminés.

Un codon ATG est introduit dans la séquence de l'oligonucléotide LF043 de façon à permettre l'initiation de la traduction du polypeptide E2 recombinant correspondant.

25 **6.1.2 pLF1023 : gène E2 , forme (β -globine tPA-E2 Δ [TM+Cter]) cloné dans le vecteur pLF999**

Le gène E2 déléte de ses domaines transmembranaire et carboxy-terminal est synthétisé par une réaction de PCR à partir de la matrice pLF1022 (exemple 6.2.1) et à l'aide du couple d'oligonucléotides suivants :

30 LF045 (41 mer) (SEQ ID NO 41)

5' CATGACGCGGCCGCCCTATGACCACAGCTTCCTAATC 3' et

LF046 (36 mer) (SEQ ID NO 42)

5' CATGACAGATCTTATATGAACTCTGAGAAGTAGTC 3'.

Le fragment d'ADN d'environ 1140 pb obtenu par digestion du produit de PCR par NotI et BglII est ligaturé avec un fragment de 5642 pb résultant de la digestion de pLF999 (exemple 2) par NotI et BglII pour générer le plasmide pLF1023 (environ 6787 pb).

Le gène E2 de BVDV-2 souche 890 ainsi modifié (β -globine tPA-E2 Δ [TM+Cter]) code pour une protéine de 405 acides aminés.

10 **6.2 Plasmides codant pour les différentes formes de E0 de la souche de type 2 - 890**

6.2.1 pLF1030 : gène E0 (forme native) cloné dans le vecteur pVR1012.

15 L'ADNc du gène E0 de la souche 890 est synthétisé à partir de l'ARN viral correspondant à l'aide de l'amorce LF065 et amplifié par une réaction de PCR à l'aide du couple d'oligonucléotides suivants :

LF064 (39 mer) (SEQ ID NO 43)

5' CATAACCGTCGACATGAGAAAGAAATTGGAGAAGGCCTG 3' et

LF065 (39 mer) (SEQ ID NO 44)

20 5' CATAACCGGATCCTCATGCTGCATGAGCACCAAACCATGC 3'.

Le fragment d'ADN d'environ 768 pb obtenu par digestion du produit de PCR par Sall et BamHI est ligaturé avec un fragment de 4866 pb résultant de la digestion de pVR1012 (exemple 2) par Sall et BamHI pour générer le plasmide pLF1030 (environ 5639 pb). Le gène E0 de BVDV-2 souche 890 code pour une protéine de 253 acides aminés.

25 Un codon ATG est introduit dans la séquence de l'oligonucléotide LF064 de façon à permettre l'initiation de la traduction du polypeptide E0 recombinant correspondant.

30 **6.2.2 pLF1031 : gène E0 , forme (β -globine tPA-E0) cloné dans le vecteur pLF999.**

Le gène E0 est synthétisé par une réaction de PCR à partir de la matrice pLF1030 (exemple 6.2.1.) et à l'aide du couple d'oligonucléotides suivants :

LF066 (42 mer) (SEQ ID NO 45)

5' CATGACGCGGCCGCTATGAGAAAGAAATTGGAGAAGGCCTG 3' et

5 LF067 (39 mer) (SEQ ID NO 46)

5' CATAACCAGATCTTCATGCTGCATGAGCACCAAACCATGC 3'.

Le fragment d'ADN d'environ 770 pb obtenu par digestion du produit de PCR par NotI et BglII est ligaturé avec un fragment de 5642 pb résultant de la digestion de pLF999 (exemple 2) par NotI et BglII pour générer le plasmide

10 pLF1031 (environ 6417 pb).

Le gène E0 de BVDV-2 souche 890 ainsi modifié (β -globine tPA-E0) code pour une protéine de 283 acides aminés.

15 **Exemple 7 : Plasmides codant pour les différentes formes des antigènes du virus parainfluenza bovin, de type 3, (bPI-3)**

Les gènes codant pour les antigènes hemagglutinine-neuraminidase (HN) et fusion (F) du virus bPI-3 sont obtenus par RT-PCR à partir de l'ARN viral de la souche Reisinger SF-4 (accessible auprès de l'ATCC sous le numéro VR-281).

20

7.1 Plasmides codant pour les différentes formes de HN de la souche bPI-3 SF-4

7.1.1 pLF1024 : gène HN (forme native) cloné dans le vecteur pVR1012.

25

L'ADNc du gène HN de la souche SF-4 est synthétisé à partir de l'ARN viral correspondant à l'aide de l'amorce LF048 et amplifié par une réaction de PCR à l'aide du couple d'oligonucléotides suivants :

LF047 (39 mer) (SEQ ID NO 47)

5' CATATCGTCGACATGGAATATTGGAAACACACAAACAGC 3' et

30

LF048 (38 mer) (SEQ ID NO 48)

5' CATGACGATATCTAGCTGCAGTTTCGGAACTTCTGT 3'.

Le fragment d'ADN de 1726 pb obtenu par digestion du produit de PCR par Sall et EcoRV est ligaturé avec un fragment de 4896 pb résultant de la digestion de pVR1012 (exemple 2) par Sall et EcoRV pour générer le plasmide pLF1024 (environ 6619 pb).

5 Le gène HN de bPI-3 code pour une protéine de 572 acides aminés.

7.1.2 pLF1025 : gène HN, forme (β -globine tPA-E2 Δ [TM]) cloné dans le vecteur pLF999

Le gène HN déléte de son domaine transmembranaire est synthétisé par une réaction de PCR à partir de la matrice pLF1024 (exemple 7.1.1) à l'aide du couple d'oligonucléotides suivants :

LF058 (33 mer) (SEQ ID NO 49)

5' CATACTGCGGCCGCTTAATTCAAGAGAACAAAT 3' et

LF059 (35 mer) (SEQ ID NO 50)

15 5' CATATCGATATCTAGCTGCAGTTTCGGAACTTC 3'.

Le fragment d'ADN de 1566 pb obtenu par digestion du produit de PCR par NotI et EcoRV est ligaturé avec un fragment de 5663 pb résultant de la digestion de pLF999 (exemple 2) par NotI et EcoRV pour générer le plasmide pLF1025 (environ 7229 pb).

20 Le gène HN de bPI-3 ainsi modifié (β -globine tPA-E2 Δ [TM]) code pour une protéine de 548 acides aminés.

7.2 Plasmides codant pour les différentes formes de F de la souche bPI-3

25 **SF-4**

7.2.1 pLF1026 : gène F (forme native) cloné dans le vecteur pVR1012.

L'ADNc du gène F de la souche SF-4 est synthétisé à partir de l'ARN viral correspondant à l'aide de l'amorce LF061 et amplifié par une réaction de PCR à

30 l'aide du couple d'oligonucléotides suivants :

LF060 (36 mer) (SEQ ID NO 51)

5' CATATCGTCGACATGATCATCACAAACACAATCATA 3' et

LF061 (36 mer) (SEQ ID NO 52)

5' CATGACCAGATCTTATTGTCTATTTGTCAGTATATA 3'.

Le fragment d'ADN de 1628 pb obtenu par digestion du produit de PCR par Sall et BgIII est ligaturé avec un fragment de 4860 pb résultant de la digestion de pVR1012 (exemple 2) par Sall et BgIII pour générer le plasmide pLF1026 (environ 6488 pb).

Le gène F de bPI-3 code pour une protéine de 550 acides aminés.

10 **7.2.2 pLF1027 : gène F, forme (β -globine tPA-F Δ [TM+Cter]) cloné dans le vecteur pLF999**

Le gène F déléte de ses domaines transmembranaire et C-terminal est synthétisé par une réaction de PCR à partir de la matrice pLF1026 (exemple 7.2.1) et à l'aide du couple d'oligonucléotides suivants :

15 LF062 (42 mer) (SEQ ID NO 53)

5' CATACTGCGGCCGCTCAAATAGACATAACAAAAGTGCAACGT 3' et

LF063 (41 mer) (SEQ ID NO 54)

5' CATATCGATATCTATGCACTAGATTGATAACCAACTTCCAAC 3'.

Le fragment d'ADN de 1434 pb obtenu par digestion du produit de PCR par NotI et EcoRV est ligaturé avec un fragment de 5663 pb résultant de la digestion de pLF999 (exemple 2) par NotI et EcoRV pour générer le plasmide pLF1027 (environ 7097 pb).

Le gène F de bPI-3 ainsi modifié (β -globine tPA-F Δ [TM+Cter]) code pour une protéine de 504 acides aminés.

25

Exemple 8 : Plasmides codant pour les différentes formes des antigènes du virus de la pseudorague (PRV)

Les gènes codant pour les glycoprotéines gB, gC et gD de PRV sont obtenus par PCR à partir de l'ADN viral de la souche NIA3 (M. Rivière *et al.* J. Virol. **66**, 3424-3434 ; A. Baskerville *et al.*, The Veterinary Bulletin, 1973, **43** n°9). Des mutants de la souche NIA3 de PRV peuvent également être utilisés et sont décrits dans

US-A-4,680,176 et déposés auprès de la Collection Nationale de Cultures de Microorganismes (CNCM), Institut Pasteur, Paris, France, sous les référence I-351 et I-352.

5 **8.1. Plasmides codant pour les différentes formes de PRV-gB**

8.1.1 pSB101 : gène gB (forme native) cloné dans le vecteur pVR1012

Le gène gB de la souche NIA3 de PRV est amplifié par PCR en utilisant l'ADN viral comme matrice et à l'aide des amorces suivantes :

10 SB201 (36 mer) (SEQ ID NO 55)

5' TTTTAAGATATCATGCCCGCTGGTGGCGGTCTTGG 3' et

SB202 (39 mer) (SEQ ID NO 56)

5' TTTTAAGGATCCCTACAGGGCGTCGGGTCCTCGCTCTC 3'.

15 Le produit d'amplification (2766 pb) est digéré par les enzymes EcoRV et BamHI et cloné dans le vecteur pVR1012 (exemple 2) préalablement digéré par EcoRV et BamHI, générant le plasmide pSB101, d'une taille d'environ 7631 pb.

Le gène gB de PRV code pour une glycoprotéine de 913 acides aminés.

8.1.2 pSB102 : gène gB (forme Δ [TM-Cter]) cloné dans le vecteur pVR1012

20 La forme tronquée du gène gB de la souche NIA3 de PRV est amplifiée par PCR en utilisant l'ADN viral comme matrice et à l'aide des amorces suivantes :

SB201 (SEQ ID NO 55) et

SB203 (39 mer) (SEQ ID NO 57)

25 5' TTTTAAGGATCCCTAGTGGTCCACCTTGACCACGCGGTC 3'.

Le produit d'amplification (2262 pb) est digéré par les enzymes EcoRV et BamHI et cloné dans le vecteur pVR1012 (exemple 2) préalablement digéré par EcoRV et BamHI, générant le plasmide pSB102, d'une taille d'environ 7142 pb.

30 La forme tronquée (Δ [TM-Cter]) du gène gB code pour une glycoprotéine de 750 acides aminés, contenant le domaine extracellulaire de la glycoprotéine gB de PRV.

8.1.3 pNS009 : gène gB (forme tPA Δ[TM-Cter]) cloné dans le vecteur pAB110

La forme tPA Δ[TM-Cter] du gène gB de la souche NIA3 de PRV est amplifiée par PCR à partir de la matrice pSB101 (exemple 8.1.1) et à l'aide des 5 amorces suivantes :

SB203 (SEQ ID NO 57) et

SB217 (39 mer) (SEQ ID NO 58)

5' AAAATTCGATATCCACCTCGGCCTGCCGACGCCGGG 3'.

Le produit d'amplification (2088 pb) est digéré par les enzymes EcoRV et 10 BgIII et cloné dans le vecteur pAB110 (exemple 2) préalablement digéré par EcoRV et BgIII, générant le plasmide pNS009, d'une taille d'environ 7127 pb.

La forme tPA Δ[TM-Cter] du gène gB code pour une glycoprotéine de 720 acides aminés, contenant le domaine extracellulaire de la glycoprotéine gB de PRV.

15

8.2 Plasmides codant pour les différentes formes de PRV-gC

8.2.1 pSB103 : gène gC (forme native) cloné dans le vecteur pVR1012

Le gène gC de la souche NIA3 de PRV est amplifié par PCR en utilisant 20 l'ADN viral comme matrice et à l'aide des amorces suivantes :

SB204 (36 mer) (SEQ ID NO 59)

5' TTTAAGATATCATGGCCTCGCTCGCGCGTGCATG 3' et

SB205 (37 mer) (SEQ ID NO 60)

5' TTTAAAGATCTTAAGGCCCGCCTGGCGGTAGTAG 3'.

25 Le produit d'amplification (1452 pb) est digéré par les enzymes EcoRV et BgIII et cloné dans le vecteur pVR1012 (exemple 2) préalablement digéré par EcoRV et BgIII, générant le plasmide pSB103, d'une taille d'environ 6323 pb.

Le gène gC de PRV code pour une glycoprotéine de 479 acides aminés.

30 **8.2.2 pSB104 : gène gC (forme Δ[TM-Cter]) cloné dans le vecteur pVR1012**

La forme tronquée du gène gC de la souche NIA3 de PRV est amplifiée par PCR en utilisant l'ADN viral comme matrice et à l'aide des amorces suivantes :

SB204 (SEQ ID NO 59) et

5 SB206 (36 mer) (SEQ ID NO 61)

5' TTTTAAAGATCTTAGGGGGAGGCGTCGTAGCGCTG 3'.

Le produit d'amplification (1332 pb) est digéré par les enzymes EcoRV et BgIII et cloné dans le vecteur pVR1012 (exemple 2) préalablement digéré par EcoRV et BgIII, générant le plasmide pSB104, d'une taille d'environ 6206 pb.

10 La forme tronquée (Δ [TM-Cter]) du gène gC code pour une glycoprotéine de 440 acides aminés, contenant le domaine extracellulaire de la glycoprotéine gC de PRV.

8.2.3 pNS012 : gène gC (forme tPA Δ [TM-Cter]) cloné dans le vecteur

15 pAB110

La forme tPA Δ [TM-Cter] du gène gC de la souche NIA3 de PRV est amplifiée par PCR à partir de la matrice pSB103 (exemple 8.2.1) et à l'aide des amorces suivantes :

SB206 (SEQ ID NO 61) et

20 SB218 (39 mer) (SEQ ID NO 62)

5' AAAATTCGATATCCACGGCGCTCGGCACGACGCCAAC 3'.

Le produit d'amplification (1270 pb) est digéré par les enzymes EcoRV et BgIII et cloné dans le vecteur pAB110 (exemple 2) préalablement digéré par EcoRV et BgIII, générant le plasmide pNS012, d'une taille d'environ 6311 pb.

25 La forme tPA Δ [TM-Cter] du gène gC code pour une glycoprotéine de 448 acides aminés, contenant le domaine extracellulaire de la glycoprotéine gC de PRV.

8.3 Plasmides codant pour les différentes formes de PRV-gD

30

8.3.1 pSB105 : gène gD (forme native) cloné dans le vecteur pVR1012

Le gène gD de la souche NIA3 de PRV est amplifié par PCR en utilisant l'ADN viral comme matrice et à l'aide des amorces suivantes :

SB207 (36 mer) (SEQ ID NO 63)

5' AATTTTGATATCATGCTGCTCGCAGCGCTATTGGCG 3' et

5 SB208 (36 mer) (SEQ ID NO 64)

5' AATTTGGATCCCTACGGACCGGGCTGCGCTTTAG 3'.

Le produit d'amplification (1227 pb) est digéré par les enzymes EcoRV et BamHI et cloné dans le vecteur pVR1012 (exemple 2) préalablement digéré par EcoRV et BamHI, générant le plasmide pSB105, d'une taille d'environ 6104 pb.

10 Le gène gD de PRV code pour une glycoprotéine de 404 acides aminés.

8.3.2 pSB106 : gène gD (forme Δ [TM-Cter]) cloné dans le vecteur pVR1012

La forme tronquée du gène gD de la souche NIA3 de PRV est amplifiée par PCR en utilisant l'ADN viral comme matrice et à l'aide des amorces suivantes :

15 SB207 (SEQ ID NO 63) et

SB209 (40 mer) (SEQ ID NO 65)

5' AAATTTGGATCCCTAGCGGTGGCGCGAGACGCCGGCGC 3'.

Le produit d'amplification (1077 pb) est digéré par les enzymes EcoRV et 20 BamHI et cloné dans le vecteur pVR1012 (exemple 2) préalablement digéré par EcoRV et BamHI, générant le plasmide pSB106 d'une taille d'environ 5957 pb.

La forme tronquée (Δ [TM-Cter]) du gène gD code pour une glycoprotéine de 355 acides aminés, contenant le domaine extracellulaire de la glycoprotéine gD de PRV.

25

8.3.3 pPB238 : gène gD (forme tPA Δ [TM-Cter]) cloné dans le vecteur pAB110

La forme tPA Δ [TM-Cter] du gène gD de la souche NIA3 de PRV est amplifiée par PCR à partir de la matrice pSB105 (exemple 8.3.1) et à l'aide des 30 amorces suivantes :

SB209 (SEQ ID NO 65) et

SB219 (39 mer) (SEQ ID NO 66)

5' AAAATTCGATATCCACCTCCCCCGCCCGCGTACCCG 3'.

Le produit d'amplification (1015 pb) est digéré par les enzymes EcoRV et BamHI et cloné dans le vecteur pAB110 (exemple 2) préalablement digéré par 5 EcoRV et BglII, générant le plasmide pPB238, d'une taille d'environ 6056 pb.

La forme tPA Δ [TM-Cter] du gène gD code pour une glycoprotéine de 363 acides aminés, contenant le domaine extracellulaire de la glycoprotéine gD de PRV.

10 **Exemple 9 : Plasmides codant pour les différentes formes des antigènes du virus du syndrome respiratoire et reproducteur porcin (PRRSV), souche Lelystad**

Les gènes codant pour les protéines COL3, COL5 et COL6 de PRRSV sont obtenus par RT-PCR à partir de l'ARN viral de la souche Lelystad (J. 15 Meulenberg *et al.* *Virology*. 1993. **19**. 62-72 ; WO-A-92-21375), déposée auprès de la Collection Nationale de Cultures de Microorganismes (CNCM), Institut Pasteur, Paris, France, sous la référence I-1140.

20 **9.1 Plasmides codant pour les différentes formes du COL3 de la souche PRRSV Lelystad**

9.1.1 pLF1009 : gène COL3 (forme native) cloné dans le vecteur pVR1012.

L'ADNc du gène COL3 de la souche Lelystad est synthétisé à partir de l'ARN viral correspondant à l'aide de l'amorce LF028 et amplifié par une réaction 25 de PCR à l'aide du couple d'oligonucléotides suivants :

LF027 (30 mer) (SEQ ID NO 67)

5' CACTACGATATCATGGCTCATCAGTGTGCA 3' et

LF028 (30 mer) (SEQ ID NO 68)

5' CACTACAGATCTTATCGTGATGTACTGGG 3'.

30 Le fragment d'ADN de 802 pb obtenu par digestion du produit de PCR par EcoRV et BglII est ligaturé avec un fragment de 4879 pb résultant de la

digestion de pVR1012 (exemple 2) par EcoRV et BglIII pour générer le plasmide pLF1009 d'une taille d'environ 5681 pb.

Le gène COL3 de PRRSV Lelystad code pour une protéine de 265 acides aminés.

5

9.2 Plasmides codant pour les différentes formes du COL5 de la souche PRRSV Lelystad

9.2.1 pLF1011 : gène COL5 (forme native) cloné dans le vecteur pVR1012.

10 L'ADNc du gène COL5 de la souche Lelystad est synthétisé à partir de l'ARN viral correspondant à l'aide de l'amorce LF020 et amplifié par une réaction de PCR à l'aide du couple d'oligonucléotides suivants :
LF019 (30 mer) (SEQ ID NO 69)
5' CTCACCGTCGACATGAGATGTTCTCACAAA 3' et
15 LF020 (30 mer) (SEQ ID NO 70)
5' CTCACCTCTAGACTAGGCCTCCCATTGCTC 3'.

20 Le fragment d'ADN de 802 pb obtenu par digestion du produit de PCR par Sall et XbaI est ligaturé avec un fragment de 4879 pb résultant de la digestion de pVR1012 (exemple 2) par Sall et XbaI pour générer le plasmide pLF1011 d'une taille d'environ 5681 pb.

Le gène COL5 de PRRSV Lelystad code pour une protéine de 201 acides aminés.

9.2.2 pLF1012 : gène COL5 (forme tronquée) cloné dans le vecteur pAB110.

25 Le gène COL5 déléte de ses domaines transmembranaire et carboxy-terminal est synthétisé par une réaction de PCR à partir de la matrice pLF1011 (exemple 9.2.1) à l'aide du couple d'oligonucléotides suivants :
LF021 (30 mer) (SEQ ID NO 71)
5' CACCTCGGATCCTTGCCGATGGCAACGGC 3' et
30 LF022 (33 mer) (SEQ ID NO 72)
5' CACCTCGGATCCTAGACTTCGGCTTGCCCAA 3'.

Le fragment d'ADN de 432 pb obtenu par digestion du produit de PCR par BamHI est ligaturé avec un fragment de 5105 pb résultant de la digestion de pAB110 (exemple 2) par BamHI pour générer le plasmide pLF1012 d'une taille d'environ 5537 pb.

5 Le gène COL5 de PRRSV Lelystad ainsi modifié (tPA Δ[TM+Cter]) code pour une protéine de 168 acides aminés.

9.3 Plasmides codant pour les différentes formes du COL6 de la souche PRRSV Lelystad

10

9.3.1 pLF1013 : gène COL6 (forme native) cloné dans le vecteur pVR1012.

L'ADNc du gène COL6 de la souche Lelystad est synthétisé à partir de l'ARN viral correspondant à l'aide de l'amorce LF024 et amplifié par une réaction de PCR à l'aide du couple d'oligonucléotides suivants :

15 LF023 (30 mer) (SEQ ID NO 73)

5' CACTCAGTCGACATGGGAGGCCTAGACGAT 3' et

LF024 (30 mer) (SEQ ID NO 74)

5' CACTCATCTAGATTACCGGCCATACTTGAC 3'.

Le fragment d'ADN de 528 pb obtenu par digestion du produit de PCR par 20 Sall et XbaI est ligaturé avec un fragment de 4881 pb résultant de la digestion de pVR1012 (exemple 2) par Sall et XbaI pour générer le plasmide pLF1013 d'une taille d'environ 5409 pb.

Le gène COL6 de PRRSV Lelystad code pour une protéine de 173 acides aminés.

25

9.3.2 pLF1014 : gène COL6 (forme tronquée) cloné dans le vecteur pAB110.

Le gène COL6 déléte de ses domaines transmembranaire et carboxy-terminal est synthétisé par une réaction de PCR à partir de la matrice pLF1013 (exemple 9.3.1) à l'aide du couple d'oligonucléotides suivants :

30 LF025 (30 mer) (SEQ ID NO 75)

5' CACTACGGATCCGTGTCACGCGGCCGACTC 3' et

LF026 (33 mer) (SEQ ID NO 76)

5' CACTACGGATCCTTAAACAGCTCGTTGCCGCC 3'.

Le fragment d'ADN de 390 pb obtenu par digestion du produit de PCR par BamHI est ligaturé avec un fragment de 5105 pb résultant de la digestion de 5 pAB110 (exemple 2) par BamHI pour générer le plasmide pLF1014 d'une taille d'environ 5495 pb.

Le gène COL6 de PRRSV Lelystad ainsi modifié (tPA Δ[TM+Cter]) code pour une protéine de 154 acides aminés.

10 **Exemple 10 : Plasmides codant pour les différentes formes des antigènes du virus du syndrome respiratoire et reproducteur porcin (PRRSV), souche américaine ATCC VR-2332**

15 Les gènes codant pour les protéines COL3, COL5 et COL6 des virus PRRSV sont obtenus par RT-PCR à partir de l'ARN viral de la souche américaine (M. Murtaugh *et al.* Arch Virol. 1995. 140. 1451-1460), déposée auprès de l'ATCC sous le numéro VR-2332.

10.1 Plasmides codant pour les différentes formes du COL3 de la souche PRRSV VR-2332

20

10.1.1 pLF1015 : gène COL3 (forme native) cloné dans le vecteur pVR1012.

L'ADNc du gène COL3 de la souche VR-2332 est synthétisé à partir de l'ARN viral correspondant à l'aide de l'amorce LF038 et amplifié par une réaction de PCR à l'aide du couple d'oligonucléotides suivants :

25 LF037 (30 mer) (SEQ ID NO 77)

5' CACTACGATATCATGGTTAACAGCTGTACA 3' et

LF038 (30 mer) (SEQ ID NO 78)

5' CACTACTCTAGACTATGCCGTACGGCACT 3'.

Le fragment d'ADN de 769 pb obtenu par digestion du produit de PCR par 30 EcoRV et XbaI est ligaturé avec un fragment de 4900 pb résultant de la digestion

de pVR1012 (exemple 2) par EcoRV et BglIII pour générer le plasmide pLF1015 d'une taille d'environ 5669 pb.

Le gène COL3 de PRRSV souche VR-2332 code pour une protéine de 254 acides aminés.

5

10.2 Plasmides codant pour les différentes formes du COL5 de la souche PRRSV VR-2332

10.2.1 pLF1017 : gène COL5 (forme native) cloné dans le vecteur pVR1012.

10 L'ADNc du gène COL5 de la souche VR-2332 est synthétisé à partir de l'ARN viral correspondant à l'aide de l'amorce LF030 et amplifié par une réaction de PCR à l'aide du couple d'oligonucléotides suivants :

LF029 (30 mer) (SEQ ID NO 79)

5' CACTACGATATCATGTTGGAGAAATGCTTG 3' et

15 LF030 (30 mer) (SEQ ID NO 80)

5' CACTACAGATCTCTAAGGACGACCCATTG 3'.

20 Le fragment d'ADN de 607 pb obtenu par digestion du produit de PCR par EcoRV et BglII est ligaturé avec un fragment de 4879 pb résultant de la digestion de pVR1012 (exemple 2) par EcoRV et BglII pour générer le plasmide pLF1017 d'une taille d'environ 5486 pb.

Le gène COL5 de PRRSV souche VR-2332 code pour une protéine de 200 acides aminés.

10.2.2 pLF1018 : gène COL5 (forme tronquée) cloné dans le vecteur pAB110.

25 Le gène COL5 déléte de ses domaines transmembranaire et carboxy-terminal est synthétisé par une réaction de PCR à partir de la matrice pLF1017 (exemple 10.2.1) à l'aide du couple d'oligonucléotides suivants :

LF031 (33 mer) (SEQ ID NO 81)

30 5' CACTACGGATCCGCCAGCAACGACAGCAGCTCC 3' et

LF032 (33 mer) (SEQ ID NO 82)

5' CACTACGGATCCTTAGACCTCAACTTTGCCCT 3'.

Le fragment d'ADN de 426 pb obtenu par digestion du produit de PCR par BamHI est ligaturé avec un fragment de 5105 pb résultant de la digestion de pAB110 (exemple 2) par BamHI pour générer le plasmide pLF1018 d'une taille d'environ 5531 pb.

Le gène COL5 de PRRSV souche VR-2332 ainsi modifié (tPA Δ [TM+Cter]) code pour une protéine de 166 acides aminés.

10.3 Plasmides codant pour les différentes formes du COL6 de la souche PRRSV VR-2332

10.3.1 pLF1019 : gène COL6 (forme native) cloné dans le vecteur pVR1012.

L'ADNc du gène COL6 de la souche VR-2332 est synthétisé à partir de l'ARN viral correspondant à l'aide de l'amorce LF034 et amplifié par une réaction de PCR à l'aide du couple d'oligonucléotides suivants :

LF033 (33 mer) (SEQ ID NO 83)

5' CACATCCTGCAGATGGGGTCGTCCTTAGATGAC 3' et

LF034 (30 mer) (SEQ ID NO 84)

5' CACATCTCTAGATTATTGGCATATTGAC 3'.

Le fragment d'ADN de 527 pb obtenu par digestion du produit de PCR par PstI et XbaI est ligaturé avec un fragment de 4871 pb résultant de la digestion de pVR1012 (exemple 2) par PstI et XbaI pour générer le plasmide pLF1019 d'une taille d'environ 5398 pb.

Le gène COL6 de PRRSV souche VR-2332 code pour une protéine de 174 acides aminés.

10.3.2 pLF1016 : gène COL6 (forme tronquée) cloné dans le vecteur pAB110.

Le gène COL6 déléte de ses domaines transmembranaire et carboxy-terminal est synthétisé par une réaction de PCR à partir de la matrice pLF1019 (exemple 10.3.1) à l'aide du couple d'oligonucléotides suivants :

LF035 (30 mer) (SEQ ID NO 85)

5' CACTACGGATCCGTGAGTCGCGGCCGACTG 3' et

LF036 (33 mer) (SEQ ID NO 86)

5' CACTACGGATCCTAACAGCTTTCTGCCACC 3'.

5 Le fragment d'ADN de 390 pb obtenu par digestion du produit de PCR par BamHI est ligaturé avec un fragment de 5105 pb résultant de la digestion de pAB110 (exemple 2) par BamHI pour générer le plasmide pLF1016 d'une taille d'environ 5495 pb.

10 Le gène COL6 de PRRSV souche VR-2332 ainsi modifié (tPA Δ [TM+Cter]) code pour une protéine de 154 acides aminés.

Exemple 11 : Plasmides codant pour les différentes formes des antigènes du virus de la grippe porcine (SIV), souche H1N1

15 Les gènes codant pour les antigènes hémagglutinine (HA) et neuraminidase (NA) du virus de la grippe porcine de type H1N1 sont obtenus par RT-PCR à partir de l'ARN viral d'une souche « SW » H1N1. Des souches sont disponibles auprès du Centre de Recherche en Virologie, Institut Armand-Frappier, Université du Quebec, Laval, Canada (D. S. Arora *et al.*, Virus Genes, 1997, **14**, 251-254). Voir aussi G. W. Both *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 20 1983, **80**, 6996-7000.

11.1 Plasmides codant pour les différentes formes de HA de la souche SIV H1N1

25 **11.1.1 pLF1001 : gène HA (forme native) cloné dans le vecteur pVR1012.**

L'ADNc du gène HA de la souche H1N1 est synthétisé à partir de l'ARN viral correspondant à l'aide de l'amorce LF004 et amplifié par une réaction de PCR à l'aide du couple d'oligonucléotides suivants :

LF003 (30 mer) (SEQ ID NO 87)

30 5' CTCCATGATATCATGGAAGCAAAACTATTC 3' et

LF004 (30 mer) (SEQ ID NO 88)

5' CTCCATCAGATCTAAATGCATATTCTGCA 3'.

Le fragment d'ADN de 1705 pb obtenu par digestion du produit de PCR par EcoRV et BgIII est ligaturé avec un fragment de 4879 pb résultant de la digestion de pVR1012 (exemple 2) par EcoRV et BgIII pour générer le plasmide 5 pLF1001 d'une taille d'environ 6584 pb.

Le gène HA de SIV H1N1 code pour une protéine de 566 acides aminés.

11.1.2 pLF1002 : gène HA (forme modifiée) cloné dans le vecteur pLF999.

Le gène HA déléte de ses domaines transmembranaire et carboxy-10 terminal est synthétisé par une réaction de PCR à partir de la matrice pLF1001 (exemple 11.1.1) à l'aide du couple d'oligonucléotides suivants :

LF005 (30 mer) (SEQ ID NO 89)

5' TCCGCGGCCGACATGCTAACAAATTCCACA 3' et

LF006 (32 mer) (SEQ ID NO 90)

15 5' TCCGCGGCCGCTTACATTGATTCTAGTTTCAC 3'.

Le fragment d'ADN de 1515 pb obtenu par digestion du produit de PCR par NotI est ligaturé avec un fragment de 5678 pb résultant de la digestion de pLF999 (exemple 2) par NotI pour générer le plasmide pLF1002 d'une taille de 7193 pb.

20 Le gène HA de SIV H1N1 ainsi modifié (intron II du gène de la β -globine du lapin, tPA, Δ [TM+Cter]) code pour une protéine de 530 acides aminés.

11.2 Plasmides codant pour les différentes formes de NA de la souche SIV H1N1

25

11.2.1 pLF1003 : gène NA (forme native) cloné dans le vecteur pVR1012.

L'ADNc du gène NA de la souche H1N1 est synthétisé à partir de l'ARN viral correspondant à l'aide de l'amorce LF008 et amplifié par une réaction de PCR à l'aide du couple d'oligonucléotides suivants :

30 LF007 (30 mer) (SEQ ID NO 91)

5' CACCTGGTCGACATGAATCCAAATCAGAAG 3' et

LF008 (30 mer) (SEQ ID NO 92)

5' CACCTGTCTAGACTACTTGTCAATGGTGAA 3'.

Le fragment d'ADN de 1416 pb obtenu par digestion du produit de PCR par Sall et XbaI est ligaturé avec un fragment de 4881 pb résultant de la 5 digestion de pVR1012 (exemple 2) par Sall et XbaI pour générer le plasmide pLF1003 d'une taille d'environ 6297 pb.

Le gène NA de SIV H1N1 code pour une protéine de 469 acides aminés.

11.2.2 pLF1004 : gène NA (forme modifiée) cloné dans le vecteur pLF999.

10 Le gène NA déléte de ses domaines transmembranaire et carboxy-terminal est synthétisé par une réaction de PCR à partir de la matrice pLF1003 à l'aide du couple d'oligonucléotides suivants :

LF009 (31 mer) (SEQ ID NO 93)

5' CACTACGAATTACAAATTGGGAATCAAAAT 3' et

15 LF010 (30 mer) (SEQ ID NO 94)

5' AATTGTGAATTCGCGGCCGCGGATCCGGT 3'.

Le fragment d'ADN de 1207 pb obtenu par digestion du produit de PCR par EcoRI est ligaturé avec un fragment de 5678 pb résultant de la digestion de pLF999 (exemple 2) par EcoRI pour générer le plasmide pLF1004 d'une taille 20 d'environ 6885 pb.

Le gène NA de SIV H1N1 ainsi modifié (intron II du gène de la β -globine du lapin, tPA, Δ [TM+Cter]) code pour une protéine de 431 acides aminés.

Exemple 12 : Plasmides codant pour les différentes formes des antigènes 25 du virus de la grippe porcine (SIV), souche H3N2

Les gènes codant pour les antigènes HA et NA du virus de la grippe porcine de type H3N2 sont obtenus par RT-PCR à partir de l'ARN viral de la souche « Côtes du Nord 1987 » (cdn87), référencée par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) et disponible auprès du National Influenza Reference Center,

30 Virology Laboratory, 8 avenue Rockefeller, 69008 Lyon, France.

12.1 Plasmides codant pour les différentes formes de HA de la souche SIV H3N2

5 12.1.1 pLF1005 : gène HA (forme native) cloné dans le vecteur pVR1012.

L'ADNc du gène HA de la souche H3N2 est synthétisé à partir de l'ARN viral correspondant à l'aide de l'amorce LF012 et amplifié par une réaction de PCR à l'aide du couple d'oligonucléotides suivants :

LF011 (30 mer) (SEQ ID NO 95)

10 5' CTGCACGTCGACATGAAGACTGTCATTGCC 3' et

LF012 (24 mer) (SEQ ID NO 96)

5' GATATCTCAGATGCAAATGTTGCA 3'.

Le fragment d'ADN de 1709 pb obtenu par digestion du produit de PCR par EcoRV et Sall est ligaturé avec un fragment de 4893 pb résultant de la 15 digestion de pVR1012 (exemple 2) par EcoRV et Sall pour générer le plasmide pLF1005 d'une taille d'environ 6602 pb.

Le gène HA de SIV H3N2 code pour une protéine de 566 acides aminés.

12.1.2 pLF1006 : gène HA (forme modifiée) cloné dans le vecteur pLF999.

20 Le gène HA déléte de ses domaines transmembranaire et carboxy-terminal est synthétisé par une réaction de PCR à partir de la matrice pLF1005 (exemple 12.1.1) à l'aide du couple d'oligonucléotides suivants :

LF013 (33 mer) (SEQ ID NO 97)

5' CACCGCGGATCCCTTCCAGAAAATGGCAGCACA 3' et

25 LF014 (33 mer) (SEQ ID NO 98)

5' CACCGCGGATCCTTAGTCTTGTATCCCGACTT 3'.

Le fragment d'ADN de 1542 pb obtenu par digestion du produit de PCR par BamHI est ligaturé avec un fragment de 5678 pb résultant de la digestion de pLF999 (exemple2) par BamHI pour générer le plasmide pLF1006 d'une taille 30 d'environ 7220 pb.

Le gène HA de SIV H3N2 ainsi modifié (intron II du gène de la β -globine du lapin, tPA, Δ [TM+Cter]) code pour une protéine de 538 acides aminés.

12.2 Plasmides codant pour les différentes formes de NA de la souche SIV

5 H3N2

12.2.1 pLF1007 : gène NA (forme native) cloné dans le vecteur pVR1012.

L'ADNc du gène NA de la souche H3N2 est synthétisé à partir de l'ARN viral correspondant à l'aide de l'amorce LF016 et amplifié par une réaction de 10 PCR à l'aide du couple d'oligonucléotides suivants :

LF015 (30 mer) (SEQ ID NO 99)

5' CACTCAGATATCATGAATCCAAAGCAAAAG 3' et

LF016 (30 mer) (SEQ ID NO 100)

5' CACTCATCTAGATTATAGGCATGAGATC 3'.

15 Le fragment d'ADN de 1414 pb obtenu par digestion du produit de PCR par EcoRV et XbaI est ligaturé avec un fragment de 4900 pb résultant de la digestion de pVR1012 (exemple 2) par EcoRV et XbaI pour générer le plasmide pLF1007 d'une taille d'environ 6314 pb.

Le gène NA de SIV H3N2 code pour une protéine de 469 acides aminés.

20

12.2.2 pLF1008 : gène NA (forme modifiée) cloné dans le vecteur pLF999.

Le gène NA déléte de ses domaines transmembranaire et carboxy-terminal est synthétisé par une réaction de PCR à partir de la matrice pLF1005 (exemple 12.2.1) à l'aide du couple d'oligonucléotides suivants :

25 LF017 (33 mer) (SEQ ID NO 101)

5' CACTACGGATCCTTCAAGCAATATGAGTGCGAC 3' et

LF018 (33 mer) (SEQ ID NO 102)

5' CACTACGGATCCTTATGAAGTCCACCATACTCT 3'

Le fragment d'ADN de 1221 pb obtenu par digestion du produit de PCR 30 par BamHI est ligaturé avec un fragment de 5678 pb résultant de la digestion de

pLF999 (exemple 2) par BamHI pour générer le plasmide pLF1008 d'une taille d'environ 6899 pb.

Le gène NA de SIV H3N2 ainsi modifié (intron II du gène de la β -globine du lapin, tPA, Δ [TM+Cter]) code pour une protéine de 431 acides aminés.

5

Exemple 13 : Plasmide codant pour le GM-CSF bovin

L'ADNc du gène GM-CSF bovin est synthétisé à partir de d'ARN cellulaire de cellules mononucléées sanguines bovines à l'aide de l'amorce LF065 et amplifié par une réaction de PCR à l'aide du couple d'oligonucléotides suivants :

10 LF054 (36 mer) (SEQ ID NO 103)

5' CATATCGTCGACATGTGGCTGCAGAACCTGCTTCTC 3' et

LF055 (34 mer) (SEQ ID NO 104)

5' CATGACCAGATCTTCACTTCTGGGCTGGTCCCCA 3'.

Le fragment d'ADN de 437 pb obtenu par digestion du produit de PCR par 15 Sall et BgIII est ligaturé avec un fragment de 4860 pb résultant de la digestion de pVR1012 (exemple 2) par Sall et BgIII pour générer le plasmide pLF1032 (environ 5297 pb). Le gène GM-CSF bovin code pour une protéine de 143 acides aminés.

20 **Exemple 14 : Plasmide codant pour le GM-CSF porcin**

L'ADNc du gène GM-CSF porcin est synthétisé à partir de d'ARN cellulaire de cellules mononucléées sanguines porcines à l'aide de l'amorce LF067 et amplifié par une réaction de PCR à l'aide du couple d'oligonucléotides suivants :

25 LF056 (36 mer) (SEQ ID NO 105)

5' CATATCGTCGACATGTGGCTGCAGAACCTGCTTCTC 3' et

LF057 (37 mer) (SEQ ID NO 106)

5' CATGACCAGATCTTCACTTCTGGGCTGGTCCCCAGCA 3'.

Le fragment d'ADN de 440 pb obtenu par digestion du produit de PCR par 30 Sall et BgIII est ligaturé avec un fragment de 4860 pb résultant de la digestion de pVR1012 (exemple 2) par Sall et BgIII pour générer le plasmide pLF1033

(environ 5300 pb). Le gène GM-CSF porcin code pour une protéine de 144 acides aminés.

Exemple 15 : Formulation des plasmides vaccinaux

5 La solution d'ADN contenant un ou plusieurs plasmides selon les exemples 3 à 14 est concentrée par précipitation éthanolique comme décrit dans Sambrook *et al.* (1989). Le culot d'ADN est repris par une solution de NaCl 0.9% de façon à obtenir une concentration de 1 mg/ml. Une solution de DMRIE-DOPE à 0,75mM est préparée par reprise d'un lyophilisat de DMRIE-DOPE par un
10 volume adapté d'H₂O stérile.

La formation des complexes ADN plasmidique-lipide est réalisée par dilution à parties égales de la solution de DMRIE-DOPE 0.75 mM par la solution d'ADN à 1 mg/ml dans NaCl 0.9%. La solution d'ADN est introduite progressivement à l'aide d'une aiguille sertie 26G le long de la paroi du flacon
15 contenant la solution de lipide cationique de façon à éviter la formation de mousse. On procède à une agitation douce dès que les deux solutions sont mélangées. On obtient en final une composition comprenant 0,375 mM de DMRIE-DOPE et 500 µg/ml de plasmide.

Il est souhaitable que l'ensemble des solutions utilisées soient à
20 température ambiante pour l'ensemble des opérations décrites ci-dessus. On laisse la complexation ADN/DMRIE-DOPE se mettre en place à température ambiante pendant 30 minutes environ avant de procéder à l'immunisation des animaux.

25 Exemple 16 : Immunisation des bovins contre BHV-1

12 bovins sont randomisés en 3 groupes de 4 animaux.

Le groupe 1 constitue le groupe des animaux témoins.

On administre aux animaux du groupe 2 un mélange de plasmides vaccinaux pPB281 (codant pour gB de BHV-1 sous une forme Δ [TM-Cter],
30 exemple 3.1.2), pPB292 (codant pour gC de BHV-1 sous une forme Δ [TM-Cter],

exemple 3.2.2) et pPB284 (codant pour gD de BHV-1 sous une forme Δ [TM-Cter], exemple 3.3.2).

On administre aux animaux du groupe 3 le même mélange que celui du groupe 2 mais formulé avec du DMRIE-DOPE comme cela est décrit dans l'exemple 15.

Une injection de 10 ml par voie intramusculaire est pratiquée à l'aide de seringues munies d'aiguille sur chaque bovin, et est répétée 21 jours plus tard. La masse totale de chaque plasmide utilisée lors de chaque immunisation est de 1500 μ g.

L'homme de l'art possède les connaissances nécessaires pour adapter le volume ou la concentration en fonction de la dose de plasmide requise.

Un suivi de la réponse sérologique induite par les deux mélanges de plasmides vaccins exprimant les antigènes gB, gC et gD de BHV-1 est réalisé sur une période de 35 jours après la primovaccination.

Les résultats sont présentés dans le tableau qui suit :

Plasmides	Formulation	Antigènes	Dose	SN à J28	SN à J35
contrôle	---	---	---	0,2 +/- 0,0	0,2 +/- 0,0
pPB281	---	gB Δ [TM-Cter]	1500 μ g	1,0 +/- 0,5	1,2 +/- 0,8
pPB292		gC Δ [TM-Cter]	1500 μ g		
pPB294		gD Δ [TM-Cter]	1500 μ g		
pPB281	DMRIE-DOPE	gB Δ [TM-Cter]	1500 μ g	2,1 +/- 0,6	2,7 +/- 0,6
pPB292		gC Δ [TM-Cter]	1500 μ g		
pPB294		gD Δ [TM-Cter]	1500 μ g		

20

Exemple 17 : Immunisation des porcs contre PRV

15 porcs, âgés d'environ 7 semaines, sont randomisés en 3 groupes de 5 animaux.

Le groupe 1 constitue le groupe des animaux témoins.

On administre aux animaux du groupe 2 un mélange de plasmides vaccinaux pNS009 (codant pour gB de PRV sous une forme tPA Δ [TM-Cter], exemple 8.1.3), pNS012 (codant pour gC de PRV sous une forme tPA Δ [TM-Cter], exemple 8.2.3) et pPB238 (codant pour gD de PRV sous une forme tPA Δ [TM-Cter], exemple 8.3.3).

On administre aux animaux du groupe 4 le même mélange que celui du groupe 3 mais formulé avec du DMRIE-DOPE comme cela est décrit dans l'exemple 15 afin d'obtenir une concentration finale en DMRIE-DOPE de 0,0535 mM.

350 μ g de chaque plasmide nécessaire pour ces protocoles de vaccination sont mélangés dans un volume final de 14 ml.

Une injection de 2 ml par voie intramusculaire est pratiquée à l'aide de seringues munies d'aiguille sur chaque porc, et est répétée à 21 jours plus tard.

Les porcs sont éprouvés à J35 par administration nasale de 2 ml d'une solution de virus d'épreuve PRV souche NIA3 à raison de 1 ml par narine et titrant $10^{7.76}$ DICC₅₀ par ml.

Un suivi du poids (en kg) de chaque animal est réalisé sur une période de 42 jours après la primovaccination.

$\Delta G7$ (en pourcentage) correspond à l'écart des pourcentages moyens de croissance pondérale d'un groupe sur une période de 7 jours débutant au jour de l'épreuve et ramené sur un jour.

Les résultats sont présentés dans le tableau qui suit :

25

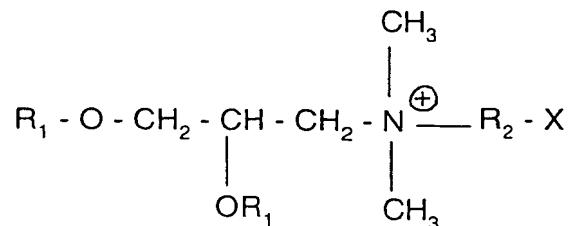
30

Plasmides	Formulation	Antigènes	Dose	Poids moyen à J35	Poids moyen à J42	$\Delta G7$
Contrôle	---	---	---	25,3 +/- 6,2	22,0 +/- 5,0	---
pNS009	---	gB Δ [TM-Cter] tPA	350 μ g	25,3 +/- 4,8	26,1 +/- 4,7	2,46
pNS012		gC Δ [TM-Cter] tPA	350 μ g			
pPB238		gD Δ [TM-Cter] tPA	350 μ g			
pNS009	DMRIE-	gB Δ [TM-Cter] tPA	350 μ g	23,8 +/- 4,5	26,2 +/- 4,9	3,41
pNS012	DOPE	gC Δ [TM-Cter] tPA	350 μ g			
pPB238		gD Δ [TM-Cter] tPA	350 μ g			

5 Il doit être bien compris que l'invention définie par les revendications annexées n'est pas limitée aux modes de réalisation particuliers indiqués dans la description ci-dessus, mais englobe les variantes qui ne sortent ni du cadre ni de l'esprit de la présente invention.

Revendications

1. Vaccin ADN contre un pathogène touchant les animaux de rente, notamment les bovins ou les porcins, comprenant un plasmide contenant une 5 séquence nucléotidique codant pour un immunogène d'un pathogène de l'espèce animale considérée, dans des conditions permettent l'expression *in vivo* de cette séquence, et un lipide cationique contenant un sel d'ammonium quaternaire, de formule



10 dans laquelle R1 est un radical aliphatique linéaire, saturé ou insaturé, ayant 12 à 18 atomes de carbone, R2 est un autre radical aliphatique, renfermant 2 ou 3 atomes de carbone, et X un groupement hydroxyle ou amine, ce lipide étant de préférence le DMRIE.

15 2. Vaccin selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'il comprend aussi du DOPE.

3. Vaccin selon la revendication 1 ou 2, caractérisé en ce qu'il comprend en outre une protéine GM-CSF de l'espèce animale considérée.

20 4. Vaccin selon la revendication 1 ou 2, caractérisé en ce qu'il comprend en outre un vecteur d'expression contenant le gène codant pour la protéine GM-CSF de l'espèce animale considérée, dans des conditions permettant l'expression *in vivo* de cette séquence.

25 5. Vaccin selon la revendication 4, caractérisé en ce que le vecteur d'expression est un plasmide.

6. Vaccin selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, caractérisé en ce que la séquence nucléotidique codant pour un immunogène de pathogène est la séquence d'un gène dont on a déléte la partie codant pour le domaine transmembranaire.

7. Vaccin selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, caractérisé en ce que le plasmide comportant la séquence nucléotidique codant pour un immunogène de pathogène comporte aussi une séquence nucléotidique codant pour une séquence signal hétérologue, de préférence pour un tPA.

8. Vaccin selon l'une quelconque des revendications 1 à 7, caractérisé en ce que le plasmide comportant la séquence nucléotidique codant pour un immunogène de pathogène comporte aussi un intron stabilisateur.

15 9. Vaccin selon la revendication 7, caractérisé en ce que l'intron est l'intron II du gène de la bêta-globine du lapin.

10. Vaccin selon l'une des revendications 1 à 5, caractérisé en ce qu'il comprend une séquence nucléotidique de BHV-1.

11. Vaccin selon la revendication 10, caractérisé en ce qu'il comprend la séquence du gène gB optimisée par une séquence signal, notamment celle du signal tPA d'origine humaine, à la place de la séquence du peptide signal de la glycoprotéine gB, et/ou par la délétion du fragment d'ADN codant pour le domaine transmembranaire de gB.

12. Vaccin selon la revendication 10, caractérisé en ce qu'il comprend la séquence du gène gC optimisée par une séquence signal, notamment celle du signal tPA d'origine humaine, à la place de la séquence du peptide signal de la

glycoprotéine gC, et/ou par la délétion du fragment d'ADN codant pour le domaine transmembranaire de gC.

13. Vaccin selon la revendication 10, caractérisé en ce qu'il comprend la
5 séquence du gène gD optimisée par une séquence signal, notamment celle du
signal tPA d'origine humaine, à la place de la séquence du peptide signal de la
glycoprotéine gD, et/ou par la délétion du fragment d'ADN codant pour le
domaine transmembranaire de gD.

10 14. Vaccin selon la revendication 10, caractérisé en ce qu'il comprend du
DMRIE-DOPE, un plasmide d'expression codant pour l'antigène gB de BHV-1
optimisé par la délétion du fragment de la séquence nucléotidique codant pour le
domaine transmembranaire et la partie C terminale contiguë, d'un deuxième
15 plasmide d'expression codant pour l'antigène gC de BHV-1 optimisé par la
délétion du fragment de la séquence nucléotidique codant pour le domaine
transmembranaire et la partie C terminale contiguë, et d'un troisième plasmide
d'expression codant pour l'antigène gD de BHV-1 optimisé par la délétion du
fragment de la séquence nucléotidique codant pour le domaine
transmembranaire et la partie C terminale contiguë.

20

15. Vaccin selon l'une des revendications 1 à 5, caractérisé en ce qu'il
comprend une séquence nucléotidique de BRSV.

25 16. Vaccin selon la revendication 15, caractérisé en ce qu'il comprend la
séquence du gène F de BRSV optimisé par substitution, par une séquence
signal, notamment celle du tPA d'origine humaine, de la séquence signal de la
protéine F de BRSV, et/ou par la délétion du fragment d'ADN codant pour le
domaine transmembranaire de F.

30 17. Vaccin selon la revendication 15, caractérisé en ce qu'il comprend la
séquence du gène G de BRSV optimisé par substitution, par une séquence

signal, notamment celle du tPA d'origine humaine, de la séquence signal de la glycoprotéine G de BRSV, et/ou par la délétion du fragment d'ADN codant pour le domaine transmembranaire de G.

5 18. Vaccin selon la revendication 15, caractérisé en ce qu'il comprend du DMRIE-DOPE, un plasmide d'expression codant pour l'antigène F de BRSV optimisé par l'insertion de la séquence signal du tPA humain à la place de la séquence signal de F, et par la délétion du fragment de la séquence nucléotidique de F codant pour le domaine transmembranaire et la partie C
10 terminale contiguë, et un deuxième plasmide d'expression codant pour l'antigène G de BRSV optimisé par l'insertion de la séquence signal du tPA humain à la place de la séquence signal de G, et par la délétion du fragment de la séquence nucléotidique codant pour le domaine transmembranaire de G et la partie C terminale contiguë.

15 19. Vaccin selon l'une des revendications 1 à 5, caractérisé en ce qu'il comprend une séquence nucléotidique de BVDV.

20 20. Vaccin selon la revendication 19, caractérisé en ce qu'il comprend la séquence du gène E1 de BVDV optimisée par addition d'une séquence signal, notamment celle du tPA d'origine humaine, en amont de la séquence nucléotidique codant pour la protéine E1, et/ou par l'insertion d'un intron, notamment de l'intron II du gène de la bêta-globine du lapin en amont de la séquence nucléotidique codant pour E1.

25 21. Vaccin selon la revendication 19, caractérisé en ce qu'il comprend la séquence du gène E2 optimisée par addition d'une séquence signal, notamment celle du tPA d'origine humaine, en amont de la séquence nucléotidique codant pour la protéine E2, et/ou par la délétion du fragment d'ADN codant pour le domaine transmembranaire de E2, et/ou par l'insertion d'un intron, notamment
30

Feuille avant rectification

de l'intron II du gène de la bêta-globine du lapin en amont de la séquence nucléotidique codant pour E2.

22. Vaccin selon la revendication 19, caractérisé en ce qu'il comprend

5 du DMRIE-DOPE, un plasmide d'expression codant pour l'antigène E1 de BVDV optimisé par l'insertion de la séquence signal du tPA humain en amont de E1 et par l'insertion de l'intron II du gène de la bêta-globine du lapin en amont de E1, et un deuxième plasmide codant pour l'antigène E2 de BVDV optimisé par l'insertion de la séquence signal du tPA humain en amont de E2, par la délétion

10 du fragment de la séquence nucléotidique codant pour le domaine transmembranaire de E2 et par l'insertion de l'intron II du gène de la bêta-globine du lapin en amont de E2.

23. Vaccin selon l'une des revendications 1 à 5, caractérisé en ce qu'il

15 comprend une séquence nucléotidique de bPI-3.

24. Vaccin selon la revendication 23, caractérisé en ce qu'il comprend la séquence du gène HN de bPI-3 optimisée par substitution, par une séquence signal, notamment celle du tPA d'origine humaine, de la séquence signal de HN,

20 et/ou par la délétion du fragment d'ADN codant pour le domaine transmembranaire de HN, et/ou par l'insertion d'un intron, notamment de l'intron II du gène de la bêta-globine du lapin en amont de la séquence nucléotidique codant pour HN.

25. Vaccin selon la revendication 23, caractérisé en ce qu'il comprend la séquence du gène F de bPI-3 optimisée par substitution, par une séquence signal, notamment celle du tPA d'origine humaine, de la séquence signal de F, et/ou par la délétion du fragment d'ADN codant pour le domaine transmembranaire de F, et/ou par l'insertion d'un intron, notamment de l'intron II

30 du gène de la bêta-globine du lapin en amont de la séquence nucléotidique codant pour F.

26. Vaccin selon la revendication 23 caractérisé en ce qu'il comprend du DMRIE-DOPE, un plasmide d'expression codant pour l'antigène HN de bPI-3 optimisé par l'insertion de la séquence signal du tPA humain à la place de la séquence signal de HN, par la délétion du fragment de la séquence nucléotidique de HN codant pour le domaine transmembranaire et la partie C terminale contiguë et par l'insertion de l'intron II du gène de la bêta-globine du lapin en amont de HN, et un deuxième plasmide d'expression codant pour l'antigène F de bPI-3 optimisé par l'insertion de la séquence signal du tPA humain à la place de la séquence signal de F, par la délétion du fragment de la séquence nucléotidique codant pour le domaine transmembranaire de F et la partie C terminale contiguë et par l'insertion de l'intron II du gène de la bêta-globine du lapin en amont de F.

15 27. Vaccin selon l'une des revendications 1 à 5, caractérisé en ce qu'il comprend une séquence nucléotidique de PRV.

28. Vaccin selon la revendication 27, caractérisé en ce qu'il comprend la séquence du gène gB optimisée par substitution, par une séquence signal, notamment celle du signal tPA d'origine humaine, de la séquence du peptide signal de la glycoprotéine gB, et/ou par la délétion du fragment d'ADN codant pour le domaine transmembranaire de gB.

25 29. Vaccin selon la revendication 27, caractérisé en ce qu'il comprend la séquence du gène gC optimisée par substitution, par une séquence signal, notamment celle du signal tPA d'origine humaine, de la séquence du peptide signal de la glycoprotéine gC, et/ou par la délétion du fragment d'ADN codant pour le domaine transmembranaire de gC.

30 30. Vaccin selon la revendication 27, caractérisé en ce qu'il comprend la séquence du gène gD optimisée par substitution, par une séquence signal,

notamment celle du signal tPA d'origine humaine, de la séquence du peptide signal de la glycoprotéine gD, et/ou par la délétion du fragment d'ADN codant pour le domaine transmembranaire de gD.

5 31. Vaccin selon la revendication 27, caractérisé en ce qu'il comprend du DMRIE-DOPE, un plasmide d'expression codant pour l'antigène gB de PRV optimisé par la délétion du fragment de la séquence nucléotidique codant pour le domaine transmembranaire et de la partie C terminale contiguë, un deuxième plasmide d'expression codant pour l'antigène gC de PRV optimisé par la délétion
10 du fragment de la séquence nucléotidique codant pour le domaine transmembranaire et de la partie C terminale contiguë, et un troisième plasmide d'expression codant pour l'antigène gD de PRV optimisé par la délétion du fragment de la séquence nucléotidique codant pour le domaine transmembranaire et de la partie C terminale contiguë.

15 32. Vaccin selon l'une des revendications 1 à 5, caractérisé en ce qu'il comprend une séquence nucléotidique de PRRSV.

20 33. Vaccin selon la revendication 32, caractérisé en ce qu'il comprend une séquence nucléotidique du gène COL3 optimisée par substitution, par une séquence signal, notamment celle du signal tPA d'origine humaine, de la séquence du peptide signal de la protéine codée par COL3, et/ou par la délétion du fragment d'ADN codant pour le domaine transmembranaire de COL3.

25 34. Vaccin selon la revendication 32, caractérisé en ce qu'il comprend une séquence nucléotidique du gène COL5 optimisée par substitution, par une séquence signal, notamment celle du signal tPA d'origine humaine, de la séquence du peptide signal de la protéine codée par COL5, et/ou par la délétion du fragment d'ADN codant pour le domaine transmembranaire de COL5.

35. Vaccin selon la revendication 32, caractérisé en ce qu'il comprend une séquence nucléotidique du gène COL6 optimisée par substitution, par une séquence signal, notamment celle du signal tPA d'origine humaine, de la séquence du peptide signal de la protéine codée par COL6, et/ou par la délétion 5 du fragment d'ADN codant pour le domaine transmembranaire de COL6.

36. Vaccin selon la revendication 32, caractérisé en ce qu'il comprend du DMRIE-DOPE, un plasmide d'expression codant pour l'antigène COL3 de PRRSV, un deuxième plasmide d'expression codant pour l'antigène COL5 de 10 PRRSV optimisé par substitution de la séquence signal de COL5 par la séquence peptide signal tPA humain et par la délétion du fragment de la séquence nucléotidique codant pour le domaine transmembranaire et la partie C terminale contiguë, et un troisième plasmide d'expression codant pour l'antigène COL6 de PRRSV optimisé par substitution de la séquence signal de COL6 par la 15 séquence peptide signal tPA humain et par la délétion du fragment de la séquence nucléotidique codant pour le domaine transmembranaire et la partie C terminale contiguë.

37. Vaccin selon l'une des revendications 1 à 5, caractérisé en ce qu'il 20 comprend une séquence nucléotidique de SIV.

38. Vaccin selon la revendication 37, caractérisé en ce qu'il comprend une séquence nucléotidique du gène HA optimisée par substitution, par une séquence signal, notamment celle du tPA d'origine humaine, de la séquence 25 signal de HA, et/ou par la délétion du fragment d'ADN codant pour le domaine transmembranaire de HA, et/ou par l'insertion d'un intron, notamment de l'intron II du gène de la bêta-globine du lapin en amont de la séquence nucléotidique codant pour HA.

30 39. Vaccin selon la revendication 37, caractérisé en ce qu'il comprend une séquence nucléotidique du gène NA optimisée par substitution, par une

séquence signal, notamment celle du tPA d'origine humaine, de la séquence signal de NA, et/ou par la délétion du fragment d'ADN codant pour le domaine transmembranaire de NA, et/ou par l'insertion d'un intron, notamment de l'intron II du gène de la bêta-globine du lapin en amont de la séquence nucléotidique codant pour NA.

40. Vaccin selon la revendication 37, caractérisé en ce qu'il comprend du DMRIE-DOPE, un plasmide d'expression codant pour l'antigène HA de SIV optimisé par l'insertion de la séquence signal du tPA humain à la place de la séquence signal de HA, par la délétion du fragment de la séquence nucléotidique de HA codant pour le domaine transmembranaire et la partie C terminale contiguë, et par l'insertion de l'intron II du gène de la bêta-globine du lapin en amont de HA, et un deuxième plasmide d'expression codant pour l'antigène NA de SIV optimisé par l'insertion de la séquence signal du tPA humain à la place de la séquence signal de NA, par la délétion du fragment de la séquence nucléotidique codant pour le domaine transmembranaire de NA et la partie C terminale contiguë, et par l'insertion de l'intron II du gène de la bêta-globine du lapin en amont de NA.

20

25

30

signal, notamment celle du tPA d'origine humaine, de la séquence signal de la glycoprotéine G de BRSV, et/ou par la délétion du fragment d'ADN codant pour le domaine transmembranaire de G.

5 18. Vaccin selon la revendication 15, caractérisé en ce qu'il comprend du DMRIE-DOPE, un plasmide d'expression codant pour l'antigène F de BRSV optimisé par l'insertion de la séquence signal du tPA humain à la place de la séquence signal de F, et par la délétion du fragment de la séquence nucléotidique de F codant pour le domaine transmembranaire et la partie C
10 terminale contiguë, et un deuxième plasmide d'expression codant pour l'antigène G de BRSV optimisé par l'insertion de la séquence signal du tPA humain à la place de la séquence signal de G, et par la délétion du fragment de la séquence nucléotidique codant pour le domaine transmembranaire de G et la partie C terminale contiguë.

15

19. Vaccin selon l'une des revendications 1 à 5, caractérisé en ce qu'il comprend une séquence nucléotidique de BVDV.

20

20. Vaccin selon la revendication 19, caractérisé en ce qu'il comprend la séquence du gène E0 de BVDV optimisée par addition d'une séquence signal, notamment celle du tPA d'origine humaine, en amont de la séquence nucléotidique codant pour la protéine E0, et/ou par l'insertion d'un intron, notamment de l'intron II du gène de la bêta-globine du lapin en amont de la séquence nucléotidique codant pour E0.

25

21. Vaccin selon la revendication 19, caractérisé en ce qu'il comprend la séquence du gène E2 optimisée par addition d'une séquence signal, notamment celle du tPA d'origine humaine, en amont de la séquence nucléotidique codant pour la protéine E2, et/ou par la délétion du fragment d'ADN codant pour le domaine transmembranaire de E2, et/ou par l'insertion d'un intron, notamment

de l'intron II du gène de la bêta-globine du lapin en amont de la séquence nucléotidique codant pour E2.

22. Vaccin selon la revendication 19, caractérisé en ce qu'il comprend
5 du DMRIE-DOPE, un plasmide d'expression codant pour l'antigène E0 de BVDV optimisé par l'insertion de la séquence signal du tPA humain en amont de E0 et par l'insertion de l'intron II du gène de la bêta-globine du lapin en amont de E0, et un deuxième plasmide codant pour l'antigène E2 de BVDV optimisé par l'insertion de la séquence signal du tPA humain en amont de E2, par la délétion
10 du fragment de la séquence nucléotidique codant pour le domaine transmembranaire de E2 et par l'insertion de l'intron II du gène de la bêta-globine du lapin en amont de E2.

23. Vaccin selon l'une des revendications 1 à 5, caractérisé en ce qu'il
15 comprend une séquence nucléotidique de bPI-3.

24. Vaccin selon la revendication 23, caractérisé en ce qu'il comprend la séquence du gène HN de bPI-3 optimisée par substitution, par une séquence signal, notamment celle du tPA d'origine humaine, de la séquence signal de HN,
20 et/ou par la délétion du fragment d'ADN codant pour le domaine transmembranaire de HN , et/ou par l'insertion d'un intron, notamment de l'intron II du gène de la bêta-globine du lapin en amont de la séquence nucléotidique codant pour HN.

25. Vaccin selon la revendication 23, caractérisé en ce qu'il comprend la séquence du gène F de bPI-3 optimisée par substitution, par une séquence signal, notamment celle du tPA d'origine humaine, de la séquence signal de F, et/ou par la délétion du fragment d'ADN codant pour le domaine transmembranaire de F , et/ou par l'insertion d'un intron, notamment de l'intron II du gène de la bêta-globine du lapin en amont de la séquence nucléotidique codant pour F.

Figure 1

Plasmide pVR1012

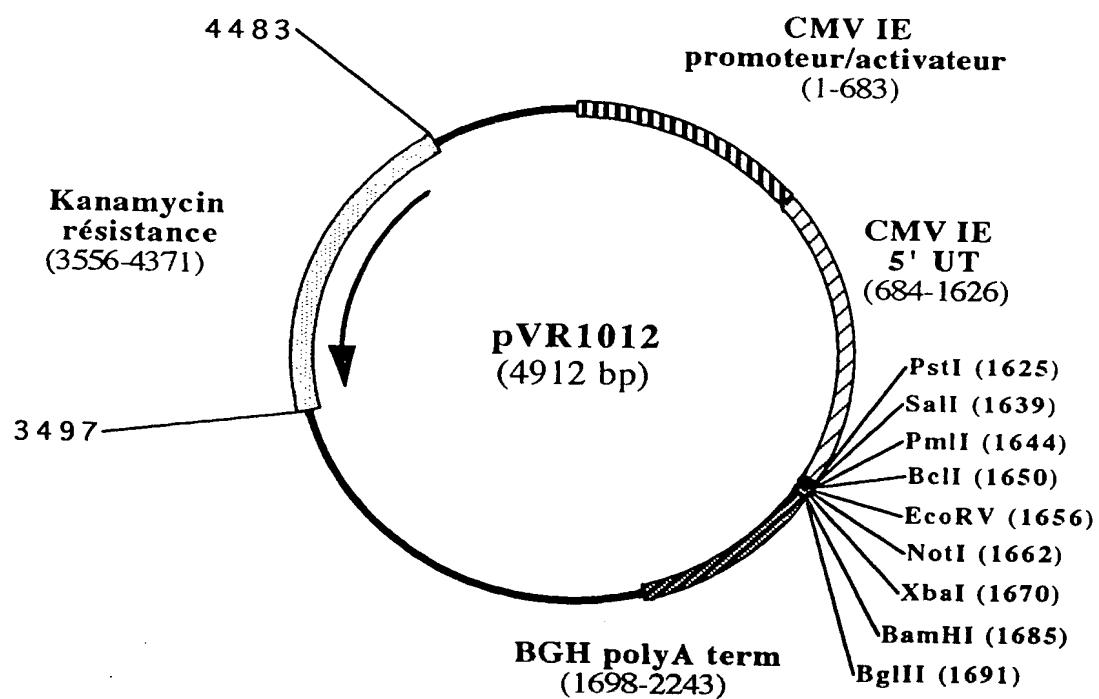


Figure 2

Plasmide pAB110

